

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PEPTIDKETTE

VON PHYTOCHROM

AUS ETIOLIERTEM HAFER

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt

von

Rudolf Grimm

aus

Dillingen/Donau

November 1987



UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PEPTIDKETTE

VON PHYTOCHROM

AUS ETIOLIERTEM HAFER

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt

von

Rudolf Grimm

aus

Dillingen/Donau

November 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026
Für Moni

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Grimm, R. und Rüdiger, W. (1986):
A simple and rapid method for isolation of 124 kDa oat phytochrome.
Z. Naturforsch. **41 c**, 988 - 992
2. Grimm, R., Lottspeich, F., Schneider, Hj.A.W. und Rüdiger, W. (1986):
Investigation of the peptide chain of 124 kDa phytochrome: Localization of proteolytic fragments and epitopes for monoclonal antibodies.
Z. Naturforsch. **41 c**, 993 - 1000
3. Schneider-Poetsch, Hj.A.W., Schwarz, H., Grimm, R. und Rüdiger, W. (1988):
Cross-reactivity of monoclonal antibodies against phytochrome from Zea and Avena and an epitope common to monocots, dicots, ferns, mosses and liverworts.
Planta **173**, 61 - 72
4. Grimm, R., Eckerskorn, Ch., Lottspeich, F., Zenger, C. und Rüdiger, W. (1988):
Sequence analysis of proteolytic fragments of 124 kDa phytochrome from etiolated Avena sativa L.: Conclusions on the conformation of the native protein.
Planta, in Druck
5. Grimm, R., Lottspeich, F. und Rüdiger, W. (1987):
Heterogeneity of the amino acid sequence of phytochrome from etiolated oat seedlings.
FEBS **225**, 215 - 217

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
1. Allgemeine Bedeutung	1
2. Das Protein	3
3. Ziele der Arbeit	6
II. Material und Methoden	9
1. Geräte	9
1.1. Photometer, Belichtungseinrichtung	9
1.2. Durchflußphotometer, Fraktionssammler	9
1.3. Zentrifugen	9
1.4. Blotkammern, Elektrophoresen, IEF-	
Kammer	10
1.5. HPLC	10
1.6. Sequenator	10
2. Chemikalien	11
3. Allgemeine und präparative Methoden	11
3.1. Trennung von Proteinen durch SDS-Gel-	
elektrophorese (PAGE)	11
3.1.1. Laemmli-System	11
3.1.2. Swank-Munkres-System	13
3.1.3. Färbung der Gele	15
3.1.3.1. Coomassie-Färbung	15
3.1.3.2. Silberfärbung	15
3.1.3.3. Negativfärbung	16
3.1.3.4. Fluoreszenz von Chromopeptiden	16
3.2. Transfer von Proteinen aus Polyacryl-	
amidgelen auf verschiedene Membranen	
und deren Anfärbung	17
3.2.1. Proteintransfer auf Nitrocellulose	17
3.2.1.1. Immunochemische Detektion	18

3.2.1.2.	Amidoschwarzfärbung	19
3.2.1.3.	Fluoreszenz von Chromopeptiden	19
3.2.2.	Proteintransfer auf Glasfaser	19
3.2.2.1.	Anfärben der Glasfaser	20
3.2.2.2.	Spotten der Glasfaser	20
3.3.	Auftrennung von Proteinen durch IEF	21
3.4.	HPLC-Trennung von Peptiden	22
3.5.	Proteolyse von Phytochrom	23
3.5.1.	Proteolyse mit endogenen Proteasen	23
3.5.2.	Proteolyse mit spezifischen Proteasen	23
3.5.3.	Inkubation mit alkalischer Phosphatase und Phosphodiesterase	24
3.6.	Phosphorylierung von Phytochrom	24
3.6.1.	Standardansatz zur Phosphorylierung mit Kinasen	24
3.6.2.	Standardansatz zur Autophosphorylierung	26
3.7.	Versuche zur Kristallisation von Phytochrom	26
3.7.1.	Präparation der Proteinproben	26
3.7.2.	Kristallisationsmedien	27
3.7.3.	Kristallisationsansatz	27
4.	Isolierung von Phytochrom	29
4.1.	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	29
4.2.	Sicherheitsvorkehrungen	30
4.3.	Photometrische Bestimmung der Phyto- chromkonzentrationen und Reinheitsgrad	30
4.4.	Reinigung von Phytochrom	31
4.4.1.	Extraktion	32
4.4.2.	PEI-Fällung	32
4.4.3.	Ammoniumsulfatfällung	33
4.4.4.	Resuspendieren	33
4.4.5.	Chromatographie an Hydroxylapatit	34
4.4.6.	Weiterreinigung über differentiell Solubilisierungsvermögen von Phytochrom	37
4.4.7.	Präzipitierungsversuche von Phytochrom	38
4.5.	Löslichkeit von nativem Phytochrom	39

III. Ergebnisse

40

1.	Entwicklung einer einfachen und schnellen Isolierungsmethode von nativem 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer	40
1.1.	Chromatographie an Hydroxylapatit	40
1.2.	Weiterreinigung von Phytochrom durch spezifische Wasch- und Präzipitations-schritte	42
1.2.1.	Löslichkeit von Phytochrom	42
1.2.2.	Präzipitationsversuche von nativem Phytochrom	43
1.3.	Kombination der Löslichkeits- und Präzipitationseigenschaften von 124 kDa-Phytochrom	44
1.4.	Reinheit des isolierten 124 kDa-Phytochroms	44
1.4.1.	Spektroskopische Charakterisierung	44
1.4.2.	Elektrophoretische Charakterisierung	47
1.4.3.	Eigenschaften gereinigter Phytochromlösungen	49
1.5.	Effizienz der Methode	50
1.6.	Charakterisierung eines 60 kDa-Kontaminationsproteins	52
2.	Untersuchungen zur Primärstruktur von Phytochrom	53
2.1.	Totalfragmentierung mit Trypsin	54
2.2.	Bestimmung des Aminoterminus	57
2.3.	Heterogenität von Phytochrom	58
2.4.	Bestimmung post-translationaler Modifikationen	61
2.4.1.	Bestimmung von Phosphatresten	61
2.4.2.	Bestimmung von Phosphodiesterbrücken	61
2.4.3.	Bestimmung von Aminosuktern	61

3.	Fragmentierung von Phytochrom mit Proteasen	64
3.1.	Proteolyse mit endogenen Proteasen	64
3.2.	Proteolyse mit Trypsin	67
3.2.1.	Inkubation mit 1 % (w/w) Trypsin bei Raumtemperatur	67
3.2.2.	Inkubation mit 0.1 % (w/w) Trypsin bei 4°C	69
3.2.3.	Unterschiede im tryptischen Abbaumuster von P _r und P _{tr}	71
3.2.4.	Lokalisierung der tryptischen Peptide in der Gesamtsequenz	72
3.3.	Proteolyse mit Endoproteinase Lys-C	76
3.4.	Proteolyse mit Endoproteinase Glu-C	80
3.5.	Proteolyse mit Subtilisin	83
3.6.	Charakterisierung kleiner Chromopeptide	86
3.6.1.	Charakterisierung eines tryptischen 23.5 kDa-Chromopeptids	86
3.6.2.	Charakterisierung eines 16 kDa-Chromopeptids aus der Proteolyse mit Subtilisin	87
3.7.	Zusammenfassung aller Schnittstellen	89
4.	Lokalisierung von Epitopen monoklonaler Antikörper	92
5.	Phosphorylierung von Phytochrom	98
6.	Versuche zur Kristallisation von Phytochrom	106
6.1.	Kristallisationsansätze im Weißlicht und bei Raumtemperatur	107
6.2.	Kristallisationsansätze von P _r und P _{tr} bei 4°C	110

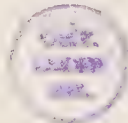
IV. Diskussion	112
1. Zur Isolierung von Phytochrom	112
2. Isophytochrome	113
3. Rückschlüsse aus den Proteolyseversuchen	115
3.1. Lokalisierung des Proteinanteils für die vollständige Protein-Chromophor-Interaktion	115
3.2. Lokalisierung des Proteinanteils für die Ausbildung des Absorptionsmaximums bei 722 nm in der P_{fr} -Form	117
3.3. Lokalisierung des Proteinanteils für die Stabilisierung der P_r -Form	119
4. Charakterisierung der Schnittstellen	120
5. Charakterisierung der Tertiärstruktur von Phytochrom	122
6. Zur Lokalisierung von Epitopen monoklonaler Antikörper	129
V. Literaturverzeichnis	130

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Dunkelrot
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FMN	Flavinmononukleotid
Gf	Glasfaser
HA	Hydroxylapatit
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazino-N'-2-ethansulfonsäure
HR	Hellrot
IEF	Isoelektrische Fokussierung
KPP	Kaliumphosphat
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
M _r	relatives Molekulargewicht
m-AK	monoklonaler Antikörper
2-ME	2-Mercaptoethanol
NC	Nitrocellulose
P _r	Hellrot absorbierende Form von Phytochrom
P _{fr}	Dunkelrot absorbierende Form von Phytochrom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Phenylthiohydantoin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT	Raumtemperatur
SAR	spezifisches Absorptionsverhältnis
	$E_{fr} : E_{hr}$
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Ein-Buchstaben-Symbole der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin



I. EINLEITUNG

1. Allgemeine Bedeutung

Viele Entwicklungsschritte von Pflanzen werden durch Änderungen der Umweltbedingungen entweder induziert (z.B. Samenkeimung, Blütenbildung) oder zumindest modifiziert (z.B. Wachstum, Bildung von Festigungselementen). Bedeutsam für die Entwicklung sind vor allem Temperatur, die Versorgung mit Wasser und anorganischen Ionen, Schwerkraft und Licht. Von allen Umweltfaktoren übt dabei wahrscheinlich Licht die vielfältigsten Einflüsse auf die pflanzliche Entwicklung aus.

Morphogenetisch wirksam sind nicht nur unterschiedliche Lichtintensitäten und Tageslängen, sondern auch verschiedene Lichtqualitäten.

Zur optimalen Anpassung der Pflanzen an die gegebenen Lichtverhältnisse haben sich verschiedene Sinnespigmente herausgebildet. Bei niederen Pflanzen, vor allem bei Pilzen, dominiert ein Blaulichtrezeptor, der zum Teil auch in höheren Pflanzen gefunden wird. Aufgrund unterschiedlicher Wirkungsspektren handelt es sich wahrscheinlich sogar um eine ganze Familie von Blaulichtrezeptoren, von denen einer Cryptochrom genannt wurde (Senger H., Vortrag auf dem Symposium "Spektroskopie von Photorezeptoren 1987, Schloß Ringberg). In Zellsuspensionskulturen wurde ebenfalls ein Photorezeptor gefunden, der maximal im nahen UV absorbiert und dessen Anregung für die Induktion bestimmter biochemischer Stoffwechselwege obligatorisch ist (Mohr und Schopfer, 1978).

Die Wirkung des UV-Rezeptors, wie auch einige Blaulichteffekte, stehen ihrerseits unter der Kontrolle des Phytochroms. Phytochrom spielt bei der Entwicklung und der Regulation von Grünalgen, Moosen, Pteridophyten und Spermatophyten eine entscheidende Rolle (Shropshire und Mohr, 1983). Es

steuert eine Vielzahl von reversiblen Photomodulationen und irreversiblen Differenzierungsprozessen (Smith, 1975, Mohr und Schopfer, 1978). So wurde unter anderem der Einfluß des Phytochromsystems auf Veränderungen in Enzymaktivitäten untersucht. Schopfer (1977) führte 52 Enzyme in verschiedenen Pflanzenspezies an, deren Aktivität durch den Einfluß von Phytochrom verändert wird. Lamb und Lawton (1983) beschrieben sogar 61 lichtregulierte Enzyme.

Phytochrominduzierte Änderungen im Gehalt an m-RNA sind ausführlich von Tobin und Silverthorne (1985) beschrieben.

Die Geschwindigkeit phytochrominduzierter Reaktionen ist dabei je nach Art des Effektes sehr verschieden. Als eine der schnellsten Phytochromreaktionen wird die P_{fr} -induzierte reversible Aggregation von Phytochrom in bestimmten Arealen des Cytoplasmas nach HR-Belichtung beschrieben (Mc Curdy und Pratt, 1986). In weniger als 10 sek. ist die Aggregation bei RT vervollständigt.

Charakteristisch für das Phytochrom sind seine photochromen Eigenschaften. Es existiert in der HR-absorbierenden P_r -Form mit einem $\lambda_{max} = 666$ nm und in der DR-absorbierenden P_{fr} -Form mit einem $\lambda_{max} = 730$ nm, die durch Belichtung ineinander überführt werden können.

Diese HR-DR Photoreversibilität führte auch zur Entdeckung des Phytochromsystems. Anhand der Samenkeimung bei *Lactuca*, die durch HR-Licht induziert und durch DR-Licht revertiert wird, postulierten Borthwick et al. (1952) einen HR-DR reversiblen Photorezeptor. Butler et al. gelang 1959 die erstmalige Isolierung des Photorezeptors und seine Charakterisierung als Protein.

2. Das Protein

Seit den ersten spektroskopischen Messungen des Photorezeptors und der Darstellung seines Proteincharakters in Rohextrakten durch Butler et al. (1959) vergingen 24 Jahre bis zur Beschreibung von Isolierungsverfahren für das native 124 kDa-Phytochrom (Kerscher, 1983, Vierstra und Quail, 1983, Litts et al., 1983).

Mumford und Jenner (1966) gelang es in ersten erfolgreichen Reinigungsversuchen zunächst ein lösliches, monomeres 60 kDa-Chromoprotein mit den erwarteten HR-DR reversiblen Spektraleigenschaften zu isolieren.

In den darauffolgenden Jahren konnte gezeigt werden, daß dieses Molekül artefiziell aus einer größeren Form mit ca. 120 kDa, dem sog. "Großen Phytochrom", während der Isolierung durch in-vitro Proteolyse entsteht (Gardner et al., 1971, Rice et al., 1973).

Im Laufe der weiteren Jahre wurde der Identifizierung molekularer Eigenschaften des gereinigten Photorezeptors beträchtliche Aufmerksamkeit geschenkt, um den molekularen Mechanismus der Phytochromaktion zu verstehen (Pratt, 1982).

1982 zeigten Gottmann und Schäfer, sowie Bolton und Quail im in-vitro Translationsversuch, daß das native Phytochrommonomer in Hafer ein M_r von 124 kDa besitzt. Sie konnten das 124 kDa-Polypeptid auch durch Extraktion von gefriergetrocknetem Material mit kochendem SDS-Puffer nachweisen.

Kerscher und Nowitzki (1982), sowie Vierstra und Quail (1982 a) wiesen nach, daß das native 124 kDa-Phytochrom, in Roggen wie in Hafer, nach der Homogenisation einer P_r -spezifischen in-vitro Proteolyse zum 118/114 kDa-Phytochrom unterworfen ist.

Vierstra und Quail (1982 a und b) fanden außerdem, daß bei der Isolierung von Phytochrom der Zusatz des Serinproteaseinhibitors PMSF und das Aufarbeiten von Phytochrom in der stabileren P_r -Form anstelle der P_r -Form die in-vitro Proteolyse des 124 kDa-Phytochroms zum 118/114 kDa-Phytochrom

weitgehend verhindern, die eine spektrale Verschiebung des Absorptionsmaximums der P_{fr} -Form von 730 nm nach 722 - 724 nm mit sich bringt.

Diese limitierte in-vitro Proteolyse durch P_r -spezifische endogene Proteasen, die mit einem hypsochromen Shift in der P_{fr} -Form einhergeht, wurde in mehr oder weniger großem Umfang bei verschiedensten Pflanzenspezies gefunden, wenn auch die Degradationsprodukte unter den Spezies variierten (Vierstra et al., 1984).

Somit waren fast sämtliche Ergebnisse über die Proteinstruktur von Phytochrom neu zu überprüfen, da alle Untersuchungen bis 1982 mit den partiell degradierten Phytochromformen von 118 und 114 kDa, dem sog. "Großen Phytochrom" durchgeführt wurden (Pratt, 1982).

Bereits erste Untersuchungen der molekularen Eigenschaften des nativen Phytochroms zeigten gegenüber der degradierten "Großen Phytochromform" signifikante Unterschiede in Bezug auf spektrale Eigenschaften, Dunkelreversion, Photogleichgewicht und die Ausbleichungsgeschwindigkeit in Gegenwart von Tetranitromethan und Ozon (Quail et al., 1983, Hahn et al., 1984, Thümmler et al., 1985).

Nach der Strukturaufklärung des P_r -Chromophors (Rüdiger et al., 1980, Rüdiger 1980, Lagarias und Rapaport, 1980) und des P_{fr} -Chromophors (Rüdiger et al., 1983, Rüdiger, 1983, Thümmler et al., 1983) gelang es schließlich Hershey et al. (1985) die Aminosäuresequenz von Phytochrom aus etioliertem Hafer aufzuklären.

Die Primärstruktur von Phytochrom, das de-novo in etiolierten Pflanzen in der P_r -Form synthetisiert wird (Quail et al., 1973) und dessen translatierbare m-RNA unter autoregulatorischer Kontrolle steht (Colbert et al., 1983), wurde aus der Basensequenz von c-DNA und genomischer DNA abgeleitet (Hershey et al., 1984, Hershey et al., 1985).

Überraschenderweise wurden mehrere Gene mit einer Homologie von 98% gefunden. Neben der starken Homologie der Exons wurde auch eine Homologie von ca. 90% bei den Introns der ver-

schiedenen Gene gefunden. (P. Quail, ESOPP 1987, Spetses). Inzwischen sind auch die Primärstrukturen von Zucchini (Sharrock et al., 1986) und Erbse (Furuya, unveröffentlicht) über den Weg der c-DNA Sequenzierung aufgeklärt worden. Sie sind zu 100% homolog (Furuya, ESOPP 1987, Spetses). Die Homologie zwischen den Phytochromsequenzen des Monokotyledonen Hafer und dem Dikotyledonen Zucchini beträgt immerhin noch 65% . Besonders konserviert ist dabei ein großer Bereich in der Chromophorregion (Sharrock et al., 1986), während der Aminotermminus und vor allem der Carboxyterminus kaum Bereiche größerer Homologien aufweisen.

Die Aminosäurezusammensetzungen von Phytochrom aus allen bisher untersuchten Pflanzenspezies zeigen ebenfalls große Übereinstimmungen (Cordonnier und Pratt, 1982, Vierstra und Quail, 1986).

Versuche zur Strukturaufklärung von Phytochrom wurden auch durch partielle proteolytische Fragmentierung der P_r - und der P_{fr} -Form und Charakterisierung verschiedener Domänen unternommen (Vierstra und Quail, 1984, Jones et al., 1985, Lagarias und Mercurio, 1985).

Mit cross-linking Experimenten gelang Jones und Quail (1986) der direkte Nachweis der Dimerisation von Phytochrom und eine annähernde Lokalisierung der Dimerisationsstelle im Protein.

Wong et al., 1986, beschrieben erstmalig auch Phosphorylierungsversuche von nativem Phytochrom mit verschiedenen Säugetierkinasen, sowie die Möglichkeit einer Kinaseaktivität von gereinigtem nativem Phytochrom.

Auch eine P_{fr} -spezifische Destruktion von Phytochrom über das Ubiquitinsystem konnte inzwischen aufgeklärt werden (Vierstra et al., 1985, Shanklin et al., 1987, Vierstra, ESOPP 1987, Spetses).

Weitere Fortschritte in der Analyse des molekularen Aufbaus von Phytochrom konnten in den letzten Jahren auch durch die Anwendung immunologischer Methoden erzielt werden. Monoklonale Antikörper wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen gegen

Phytochrom aus verschiedenen Spezies hergestellt (Cordonnier et al., 1983: Avena, Pisum; Nagatani et al., 1984: Pisum; Silberman et al., 1985: Avena; Daniels und Quail, 1984: Avena, Schwarz, H. und Schneider, H.J.A.W., 1987: Zea, Avena). Sie wurden insbesondere zur Analyse von in-vitro Abbauprodukten durch endogene oder exogene Proteasen verwendet (Daniels und Quail, 1985, Nagatani et al., 1984, Tokuhisa et al., 1985, Cordonnier et al., 1985, Jones et al., 1985, Silberman et al., 1985), zur immunologischen Diskriminierung von P₁ und P₂ (Thomas et al., 1984, Cordonnier et al., 1985, Holdsworth M.L., ESOPP 1987, Plumpton Ch., ESOPP 1987) und zur Analyse und Diskriminierung unterschiedlicher Phytochrome aus etiolierten und grünen Pflanzen von Avena sativa (Tokuhisa et al., 1985 und Shimazaki und Pratt, 1985).

3. Ziele dieser Arbeit

Trotz der enormen Fortschritte in der Analyse der molekularen Eigenschaften von nativem 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer, blieben dennoch viele Fragen offen, die vor allem die Primär- und Tertiärstruktur des Proteins betreffen.

Ein großer Mangel aller Fragmentierungsversuche und Charakterisierungsversuche von bestimmten Domänen, die bisher in der Literatur beschrieben wurden, stellte das Fehlen von sequenziellen Daten der Peptide dar. Sie erlauben erst eine exakte Lokalisierung zumindest des Aminoterminus des jeweiligen Fragments in der Gesamtsequenz und lassen durch die Beschreibung bevorzugter proteolytischer Schnittstellen im Protein relativ genaue Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur zu, die für die physiologische Funktion verantwortlich ist. Die einzigen bisher bekannten Phytochromsequenzen entspringen der Sequenzierung eines kleinen Chromopeptids (Fry und Mumford, 1971 und Lagarias und Rapaport, 1980), sowie den von Hunt und Pratt (1980) bestimmten Aminotermini für das

"Große Phytochrom", die sich inzwischen aber als unkorrekt erwiesen haben (Hershey et al., 1985).

Zur Absicherung der aus der Basensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von nativem Phytochrom aus Hafer (Hershey et al., 1985), sollte das Polypeptid bzw. proteolytische Fragmente davon zumindest auch partiell auf proteinchemischem Weg sequenziert werden.

Auch schien es interessant und von großer Bedeutung nachzuprüfen, ob die von Hershey et al. (1985) beschriebenen multiplen Phytochromgene auch tatsächlich in der Pflanze in die entsprechenden Proteine umgesetzt werden.

Durch gezielte Partialproteolyse mit endogenen Proteasen und vor allem mit hochspezifischen Endopeptidasen sollte natives Phytochrom in der P_r - und P_{Ir} -Form fragmentiert werden, die Fragmente spektroskopisch untersucht, ansequenziert und in der Gesamtsequenz lokalisiert werden. Auf diesem Weg sollte es möglich sein, stabile Domänen im Protein exakt zu lokalisieren und zu charakterisieren. Durch die Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen zahlreicher Peptide, die aus der Fragmentierung mit Proteasen unterschiedlicher Spaltungsspezifität entstehen, wäre auch die Möglichkeit gegeben, bevorzugte Schnittstellen sowohl in der P_r -Form, als auch in der P_{Ir} -Form, sowie proteolytische Schnittstellen, die in beiden Formen gleichermaßen zugänglich sind, zu definieren. Dadurch könnten auch exakte Rückschlüsse auf die Teile des Proteins gezogen werden, die sich im Inneren des Proteins und auf der Proteinoberfläche befinden bzw. nach beginnender Partialproteolyse zugänglich gemacht werden.

Auch könnten die Proteinsegmente identifiziert werden, die während der Phototransformation von P_r zu P_{Ir} oder umgekehrt die Konformationsänderung im Protein durchführen.

Da für die zahlreichen Fragmentierungs- und Sequenzierungsversuche hochgereinigtes natives Phytochrom in ausreichenden Mengen benötigt wurde, war es auch erforderlich ein Isolierungsverfahren zu entwickeln, das es ermöglicht, in kurzer Zeit mit relativ geringem Aufwand reines Protein in großem

Umfang zu isolieren. Mit hochgereinigten Proteinlösungen könnten dann auch weitere Eigenschaften charakterisiert werden hinsichtlich post-translationaler Modifikationen, eventueller Enzymaktivitäten oder sogar die Kristallisation von Phytochrom versucht werden. Die Lokalisierung unterschiedlicher proteolytischer Fragmente in der Gesamtsequenz von nativem Phytochrom sollte schließlich auch eine relativ genaue Lokalisierung von Epitopen für verschiedene monoklonale Antikörper über Western-Blotanalyse der lokalisierten Fragmente ermöglichen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Geräte

1.1. Photometer, Belichtungseinrichtung

UV-VIS-Spektren wurden mit einem Zweistrahlspektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator (Fa. Zeiss, Oberkochen) aufgenommen.

Die Belichtung der Proben erfolgte in den Küvettenräumen des Photometers, das über eine Eigenbau-Belichtungseinrichtung verfügt. Wesentliche Bestandteile sind eine 12 V Halogenlampe und 2 Interferenzfilter (Fa. Searom, Argenteil, Frankreich) mit Wellenlängen von 660.3 nm und 728.3 nm. Gemessen im Bereich des Meßstrahles des Photometers ergab sich am Ort der Küvette für den HR-Filter eine Lichtflußrate von 64 Wm^{-1} , für den DR-Filter von 3.1 Wm^{-1} .

1.2. Durchflußphotometer, Fraktionssammler

Die Transmission von Säuleneluaten wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord II der Fa. LKB bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen und mit einem Schreiber Typ WPS 1 der Fa. Colora (Lorch) registriert. Eluate wurden mit einem Fraktionssammler Typ Mini Escargot der Fa. Gilson (Frankreich), gesammelt.

1.3. Zentrifugen

Zum Einsatz kamen die Kühlzentrifugen G 50 K der Fa. WKF und die Zentrifugen Centrikon H-401 der Fa. Kontron, Hermle.

Benützt wurden folgende Rotoren:

WKF G 50 K : 6 x 500 ml mit 19000 g bei 10000 upm

6 x 250 ml mit 42400 g bei 16000 upm

Kontron : A. 8.24 mit 46000 g bei 20000 upm
A.24.24 mit 46000 g bei 20000 upm

1.4. Blotkammern, Elektrophoresen, IEF-Kammer

Bei Arbeiten im Institut wurden Eigenbau-Blotkammern und Eigenbau-Elektrophoreseapparaturen verwendet.

IEF wurden mit einer käuflichen Multiphor II-IEF-Kammer, Nr. 2117' der Firma LKB, durchgeführt.

Semi-dry-Blots von SDS-Polyacrylamidgelen auf Gf wurden mit käuflichen Semi-dry-Blotkammern der Firmen Sartorius und Biometra durchgeführt.

1.5. HPLC

HPLC-Auftrennungen wurden an HPLC-Geräten der Fa. LKB mit den Typen 2050, 2051 und 2052 durchgeführt.

Für die Trennungen von kleinen Peptiden wurden HPLC-Säulen der Firmen Bischoff (Leonberg) und Chrompack (Müllheim) verwendet.

1.6. Sequenator

Aminoterminal Sequenzanalysen wurden mit einem Gasphasensequenator 470 A von Applied Biosystems durchgeführt.

Die Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden über ein isokratisches HPLC-System aufgetrennt und identifiziert (F. Lottspeich, 1985). Die Detektionsgrenze betrug 5 pmol Protein bzw. 500 fmol PTH-Aminosäuren.

2. Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, hatten alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zumindest den Reinheitsgrad "zur Analyse". Alle proteolytischen Enzyme sind Produkte der Fa. Boehringer Mannheim, mit Ausnahme von Subtilisin (Fa. Sigma) und Trypsin (Fa. Merck).

Zur Herstellung aller Lösungen wurde destilliertes oder bi-destilliertes Wasser verwendet.

3. Allgemeine analytische und präparative Methoden

3.1. Trennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese (PAGE)

Die PAGE erfolgte auf Gradienten- und Festgelen nach modifizierten Angaben von Laemmli (1970) sowie von Swank and Mun-kres (1971).

3.1.1. Laemmli-System

Zur Anwendung kamen Polyacrylamidgele mit folgenden Acryl-
amid-Konzentrationen:

7.5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 7.5-15% und 15-25%

Folgende Stammlösungen wurden benötigt:

30% Acrylamid + 0.8% Bisacrylamid

60% Acrylamid + 1.6% Bisacrylamid

60% Sucrose

1.5 M Tris / HCl pH 8.8

0.5 M Tris / HCl pH 6.8

10% APS

10% SDS

Gele (sämtliche Mengen sind auf 15 ml Gelvolumen bezogen):

a) Sammelgel (5%)

30% Acrylamid + 0.8% Bisacrylamid	2.5 ml
0.5 M Tris / HCl pH 6.8	3.8 ml
10% SDS	0.3 ml
H ₂ O	8.3 ml
TEMED	14 µl
10% APS	100 µl

b) <u>Trenngel</u>	7.5%	10%	15%	20%	25%
30% Acrylamid + 0.8% Bisacrylamid	3.75 ml	5.00 ml	7.5 ml	-	-
60% Acrylamid + 1.6% Bisacrylamid	-	-	-	5.00 ml	6.25 ml
1.5M Tris/HCl pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
60% Sucrose	1.00 ml	1.35 ml	1.85 ml	2.80 ml	3.50 ml
H ₂ O	6.40 ml	4.90 ml	1.90 ml	3.40 ml	1.50 ml
TEMED	11.2 µl	8.8 µl	6.6 µl	4.9 µl	4.4 µl
10% APS	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl

c) Laufpuffer:

Oberer Laufpuffer (Kathode)

0.025 M Tris / HCl pH 8.3

0.192 M Glycin

0.1 % SDS

0.1 % 2-ME

1 mM Na₂EDTA

Unterer Laufpuffer (Anode)

0.025 M Tris / HCl pH 8.3

0.192 M Glycin

d) Probenpuffer

65 mM Tris / HCl pH 7.8

5 % (v/v) 2-ME

2 % SDS

15 % (v/v) Glycerin

0.5 % Bromphenolblau

e) Laufbedingungen (gültig für: 1 mm Gele)

Gele mit 7.5%, 10%, 15% : 8 - 10 mA

Gele mit 20%, 25% : 13 - 16 mA

jeweils 16 h bei RT

f) Trennleistung

Gele	Gesamter Trennbereich (kDa)	Optimum (kDa) im Trennbereich
7.5 %	250 - 60	200 - 100
10 %	200 - 25	90 - 40
15 %	200 - 15	50 - 20
7.5 - 15%	250 - 15	
20 %	70 - 5	30 - 10
25 %	40 - 2	20 - 2
15 - 25%	60 - 2	

3.1.2. Swank-Munkres-System

Zur Anwendung kamen Polyacrylamidgele mit 13% Acrylamid und 8 M Harnstoff.

Folgende Stammlösungen wurden benötigt:

35.7% Acrylamid + 0.78% Bisacrylamid

10 % SDS

10 % APS

Gele

a) Trenngel

Tris	0.7	g
Harnstoff	9.7	g
H ₂ PO ₄ (85%)	0.265	ml
H ₂ O	4.38	ml
35.7% Acrylamid + 0.78% Bisacrylamid	7.28	ml
TEMED	20	µl

entgasen

10% SDS	0.2	ml
---------	-----	----

2.5 ml für Sammelgel entnehmen

10% APS	60	µl
---------	----	----

b) Sammelgel

Trenngel	2.5	ml
H ₂ O	2.5	ml
10% SDS	25	µl
TEMED	2.5	µl
10% APS	25	µl

Laufpuffer (10-fach konzentriert ad 1 Liter pH 6.8)

Tris	170	g
H ₂ PO ₄ (85%)	66.8	ml
SDS	10	g

Laufbedingungen (gültig für: 1 mm Gele)

15 mA, 16 h bei RT

Trennleistung

Sie liegt zwischen 70 - 1 kDa, mit optimaler Trennleistung zwischen 25 - 1 kDa.

3.1.3. Färbung der Gele

3.1.3.1. Coomassie-Färbung

Die Gele wurden 45 min. in einer Lösung von 0.2% Coomassie Brilliant Blue, 7% Eisessig und 50% Methanol angefärbt. Anschließend wurde mit einer Lösung von 10% Eisessig und 40% Methanol unter mehrfachem Wechsel so lange entfärbt, bis der Hintergrund des Gels farblos erschien.

3.1.3.2. Silberfärbung

Zur Anwendung kam die etwas modifizierte Methode nach Ansorge (1982).

Die Gele können entweder direkt oder nach vorheriger Coomassiefärbung und Entfärbung verwendet werden.

- | | |
|--|-------------|
| a) 20% TCA, 50% MeOH, 2% CuCl ₂ , 0.1% HCHO | 15 min. |
| b) 10% EtOH, 5% HAc | 10 min. |
| c) 0.01% KMnO ₄ , 0.01% KOH | 10 min. |
| d) 10% EtOH, 5% HAc | 5 - 10 min. |
| e) 10% EtOH | 10 min. |
| f) H ₂ O | 10 min. |
| g) 0.2% AgNO ₃ | 10 min. |
| h) H ₂ O | 10 sec. |
| i) 2% Na ₂ CO ₃ , 0.01% HCHO | 5 - 10 min. |
| k) 10% EtOH, 5% HAc | 1 min. |

Bei Überentwicklung der Gele oder bei Gelbfärbung des Hintergrundes empfiehlt sich folgende Recycling-Methode:

- l) Farmer's Reducer 5 - 10 min.
(2 g $K_4[Fe(CN)_6]$, 4 g $Na_2S_2O_4$ ad 250 ml)
- m) fließendes Leitungswasser 1 min.
- n) Wiederholung der Schritte d) - k)

Vor dem Trocknen müssen die Gele noch 15 min in H_2O gelegt werden!

3.1.3.3. Negativfärbung

Man erhält eine - im Vergleich zu der von Higgins et al. (1979) beschriebenen Methode mit 4 M Na-acetat - weitaus schnellere und bessere Negativfärbung, wenn man die Gele in 300 mM Zn-acetat legt. Bereits nach 5 min. tritt eine vollständige Negativfärbung auf.

3.1.3.4. Fluoreszenz von Chromopeptiden (Berkelman, 1986)

Gibt man in die Laufpuffer 2 mM Zn-acetat, so können im Polyacrylamidgel Peptide mit einem kovalentgebundenen linearen Tetrapyrrol durch Anregung bei 302 nm mit einer 40 W UV-Lampe als orange fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden.

3.2. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf verschiedene Membranen und deren Anfärbung.

3.2.1. Proteintransfer auf Nitrocellulose (Western-Blot)

Sollten aufgetrennte Proteine immunologisch analysiert werden oder insbesondere proteolytische Fragmente mit definierter Sequenz auf Epitope monoklonaler Antikörper untersucht werden, so erfolgte der elektrophoretische Transfer der Peptide auf NC (Schleicher & Schüll BA 85, 0.45 μ m) in einer von der Werkstatt des Botanischen Institutes gefertigten Transblot-Kammer.

Dazu wurde folgendes Sandwich hergestellt:

1. Perforierte Kunststoffplatte
2. Kunstfasergewebe, mit Blotpuffer befeuchtet
3. Filterpapier (Whatman 3 mm), mit Blotpuffer befeuchtet
4. Polyacrylamidgel, leicht mit Blotpuffer angefeuchtet
5. NC, die ca. 30 sec. in Blotpuffer geflotet wurde und dann luftblasenfrei aufgelegt wurde
6. Filterpapier (vgl. 3)
7. Kunstfasergewebe (vgl. 2)
8. Perforierte Kunststoffplatte (vgl. 1)

Das Sandwich wurde in die mit Blotpuffer (25 mM Tris / HCl pH 8.3 , 192 mM Glycin, 0.025% SDS) gefüllte Trans-Blotkammer eingeführt, wobei die NC zur Anode orientiert wurde. Die Proteine wurden innerhalb von 3 h bei 150 mA auf die NC übertragen. Nach diesem für Proteine erstmals von Towbin et al. (1979) beschriebenen Verfahren, dessen verschiedene Anwendungstechniken von Gershoni et al. (1983) zusammengefaßt wurden, sind diese praktisch vollkommen auf der NC immobilisiert.

3.2.1.1. Immunochemische Detektion der geblotteten Proteine

Verwendet wurden:

- a) zum Blocken der unbesetzten Bindungsstellen auf der NC und zum Verdünnen der Antikörper folgender Milchpuffer:
- 100 mM Tris / HCl pH 7.4
 - 150 mM NaCl
 - 0.3 % Trockenmilch
 - 0.02% Natriumazid
- b) zur Entwicklung der Farbreaktion jeweils ein Agarose-Färbegel (120 x 100 x 0.72 mm):
- | | |
|--------------------------|---------|
| H ₂ O | 8.75 ml |
| Agar | 250 mg |
| 2.5 M Tris / HCl pH 9.75 | 3.70 ml |
| Farblösung | 50 µl |
- (Farblösung: Stammlösung: 100 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat-p-Toluidinsalz in 1 ml DMSO)

Folgendes Verfahren kam zur Anwendung:

1. 1 h NC mit Milchpuffer blocken (3 x wechseln)
2. 3 h Inkubation mit monoklonalen Anti-Phytochrom-Antikörper aus Maus, 1 : 1000 verdünnt (primärer Antikörper)
3. 1 h in Milchpuffer waschen (3 x wechseln)
4. 1 h Inkubation mit polyklonalen Goat-Anti-Mouse-Antikörpern, alkaline Phosphatase konjugiert, 1 : 1000 verdünnt (sekundärer Antikörper)
5. 1 h in Milchpuffer waschen (3 x wechseln)
6. 10 sec. in H₂O waschen
7. Auflegen der NC auf ein Agarose-Färbegel bis zur Entwicklung blauer Banden auf weißem Hintergrund auf der NC
8. Stop der Farbentwicklung durch Waschen der NC mit Wasser

3.2.1.2. Amidoschwarzfärbung

Nach dem Proteintransfer auf NC wurden Referenzstreifen mit Markerproteinen mit definierten M_r und diversen charakteristischen Abbauproben 5 min. in 0.1% Amidoschwarz (w/v) in 10% Essigsäure und 25% Isopropanol angefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit 10% Essigsäure und 25% Isopropanol.

3.2.1.3. Fluoreszenz von Chromopeptiden auf NC

Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die NC für 30 min. in 20 mM Zn-acetat, 150 mM Tris / HCl pH 7 inkubiert. Peptide mit einem kovalentgebundenen linearen Tetrapyrrol als Chromophor können anschließend durch Anregung bei 302 nm mit einer 40 W UV-Lampe als orange fluoreszierende Banden sichtbar gemacht werden (A. Jones, persönliche Mitteilung).

3.2.2. Proteintransfer auf Gf (Semi-dry-Blot)

Dieses Verfahren, das von R. Aebersold et al. (1986) eingeführt wurde und inzwischen von Ch. Eckerskorn wesentlich modifiziert und verbessert wurde (Eckerskorn Ch., erreicht), ermöglicht es Proteine aus Polyacrylamidgelen auf aktivierte Gf zu transferieren und zu immobilisieren.

Die gespotteten Gf-Sheets können dann sofort zur Microsequenzierung in den Gasphasensequenator eingebracht werden.

Für den Elektrotransfer wurden Semi-dry-Blotkammern der Firmen Biometra und Sartorius verwendet.

Aufbau des Sandwich

1. Drei Schichten Filterpapier, mit Blotpuffer getränkt, werden auf die untere Graphitplatte (Kathode) gelegt
2. Polyacrylamidgel, mit Blotpuffer befeuchtet
3. Aktivierte Gf, 30 sec. in Blotpuffer geflotet und luftblasenfrei aufgelegt
4. Drei Schichten Filterpapier, mit Blotpuffer getränkt
5. Obere Graphitplatte (Anode)

Blotpuffer

50 mM NaBO_3 , 20% Methanol pH 8.3

Blotbedingungen

150 mA, 3 h bei RT

3.2.2.1. Anfärbung der Gf

Nach erfolgtem Proteintransfer auf Gf wurden die Sheets 2 min. in 0.1% Coomassie in 10% Essigsäure, 40% Methanol, angefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 10% Essigsäure, 40% Methanol unter mehrfachem Wechsel.

3.2.2.2. Spotten der Gf

Nach dem Entfärben werden die Gf-Sheets mit Filterpapier gut getrocknet und die jeweiligen Spots mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Glasspots wurden dann bis zur Sequenzierung unter N_2 -Atmosphäre bei -30°C aufbewahrt.

3.3. Auftrennung von Proteinen durch IEF

Für die Auftrennung von Proteinen durch IEF wurde die Vorschrift der Firma LKB verwendet.

Verwendet wurden Agarosegele (260 x 120 x 0.75 mm) mit 8 M Harnstoff folgender Zusammensetzung ad 23 ml:

IEF-Agarose	0.23 g
Sorbit	2.76 g
Harnstoff	11.10 g
H ₂ O	12.54 ml
DTT (St.: 10 mg / ml)	0.46 ml
Servalyt 5 - 7	1.20 ml
Servalyt 3 - 10	0.30 ml

Bei der Anfertigung der Gelkassette wurden jeweils eine unbeschichtete und eine Agarose-beschichtete Folie (Fa. Serva) verwendet.

Elektrodenlösungen

Kathode 1 M NaOH

Anode 0.1 M HAc

Laufbedingungen

Vorfokussieren bis $\frac{1}{4}$ der Ausgangsstromstärke erreicht ist.

Entsalzen bei 150 V für 30 min.

Hauptfokussieren bei 1500 V für 6 h.

Fixieren

20% TCA oder 10% TCA, 5% Sulfosalicylsäure

Nach dem Fixieren wurden die Gele mit 7% Essigsäure, 53% Methanol gewaschen. Anschließend wurden sie ca. 15 min. mit Filterpapier durch Auflegen von ca. 1 kg Gewicht vorgetrocknet. Die vollständige Trocknung erfolgte dann mit einem Föhn. Nach dem Anfärben der Gele in 0.2% Coomassie in 7% Essigsäu-

re, 53% Methanol für 15 min., wurden sie mit 7% Essigsäure, 53% Methanol entfärbt und zur Konservierung trocken geföhnt.

3.4. HPLC-Trennung von Peptiden

1.8 mg 124 kDa-Phytochrom wurden zur vollständigen Durchspaltung mit 5% (w/w) Trypsin 70 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die proteolytische Reaktion wurde durch Ansäuern mit Ameisensäure auf pH 2.6 gestoppt.

Die Aufreinigung der tryptischen Peptide zum Sequenzieren erfolgte zunächst über eine Vydac-Säule (250 x 4.6 mm, Fa. Chrompack) mit folgenden Laufbedingungen:

Menge	250 µl
Puffer	0.1% TFA - 0.1% TFA / Acetonitril
Gradient	5 - 40 in 50 min.
Flow	0.8 ml / min.
Wellenlänge	203 nm

Verschiedene Fraktionen wurden nun zur endgültigen Reinigung über eine ODS II-Säule (250 x 4.6 mm, Fa. Bischoff) mit folgenden Laufbedingungen rechromatographiert:

Menge	150 - 180 µl
Puffer	0.1% TFA - 0.1% TFA / Acetonitril
Gradient	5 - 50, 5 - 65 in 30 min.
Flow	1 ml / min.
Wellenlänge	206 nm

Von den verschiedenen Fraktionen wurden jeweils 10% zur Aminosäureanalyse abgenommen. Die restlichen Volumina wurden mit einer Speed-Vac-Zentrifuge auf 30 - 50 µl einrotiert und im Kühlschrank für einen Sequenatorlauf aufbewahrt.

3.5. Proteolyse von Phytochrom

Für eine limitierte Proteolyse von Phytochrom in der P_r - und P_{rr} -Form unter kontrollierten Bedingungen wurden folgende Ansätze durchgeführt:

3.5.1. Proteolyse mit endogenen Proteasen

Endogene Proteasen wurden durch Extraktion von 15 g etiolierten Haferkeimlingen mit 30 ml 25 mM MOPS, 25 mM Tris, 14 mM 2-ME pH 7.5 und Zentrifugation des Rohextraktes bei 30000 g (Grombein and Rüdiger, 1976) präpariert.

Davon wurden je 100 μ l zu 1000 μ l reiner Phytochromlösung in der P_r - und P_{rr} -Form hinzugefügt. Die Ansätze wurden jeweils nach Zugabe von 0.4 M 2-ME bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Nach definierten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen und über SDS-PAGE aufgetrennt.

3.5.2. Proteolyse mit spezifischen Proteasen

Für die Proteolyse mit spezifischen Endopeptidasen wurden Stammlösungen von 1 mg / ml, sowie 1 : 10- und 1 : 100-Verdünnungen folgender Proteasen in 10 mM KPP, 5 mM EDTA, 14 mM 2-ME pH 7.8 angesetzt:

Trypsin	(from pig, crystallized, 8.0 U/mg)
Endoproteinase Glu-C	(from Staph. aureus V8, 20 U/mg)
Endoproteinase Lys-C	(from Lysobacter enzymogenes, 30 U/mg)
Subtilisin	(Subtilisin Carlsberg from Bacillus subtilis, 7 - 15 U/mg Subtilisin nagarse, 7 - 14 U/mg)

Die Inkubation von Phytochrom in 10 mM KPP, 5 mM EDTA, 14 mM 2-ME pH 7.8 mit 1% (w/w) Subtilisin, Endoproteinase

Glu-C und Endoproteinase Lys-C erfolgte bei RT im Dunkeln. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte mit 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 und 0.01% (w/w) Protease bei RT und bei 4°C jeweils im Dunkeln.

Nach definierten Zeiten wurden Aliquots entnommen und über SDS-PAGE aufgetrennt.

Die proteolytischen Reaktionen wurden durch Zugabe von 4 mM PMSF sowie durch Erwärmen der im SDS-Probenpuffer aufgenommenen Aliquots im Wasserbad für 15 min. bei 80°C gestoppt.

3.5.3. Inkubation mit alkalischer Phosphatase und Phosphodiesterase

Je 100 µl (ca. 75 µg) Phytochromlösung in P_r - und P_{fr} -Form wurden für jeweils 30 min., 1 h und 2 h mit je 2 U alkalischer Phosphatase bzw. je 0.02 U Phosphodiesterase inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für die IEF mit 1.6 M Ammoniumsulfat gefällt und in 15 µl 8.9 M Harnstoff, 2% DTT aufgenommen.

3.6. Phosphorylierung von Phytochrom

3.6.1. Standardansatz zur Phosphorylierung mit Kinasen

Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Th. Priester, Botanisches Institut der Universität Tübingen, durchgeführt.

Verwendet wurden folgende Stammlösungen:

Kinasepuffer : 250 mM Hepes, 25 mM MgCl₂, 1 mM EGTA,
1.5 mM CaCl₂ pH 7.0

Phytochrom : 0.7 mg / ml 124 kDa-Phytochrom in P_r -
und P_{fr} -Form bzw. tryptische Peptide

in 10 mM KPP und in 10 mM Hepes pH 7.8

Substrat	:	Casein bzw. Histon III S je 0.5 mg/ml
ATP	:	66 μ M
Kinase	:	Aktive Fraktionen aus Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation eines Rohextraktes aus etioliierten Maiskeimlingen.

Folgender Ansatz wurde durchgeführt (nach Th. Priester):

Kinasepuffer	:	25 μ l
Phytochrom	:	30 μ l
Substrat, oder H ₂ O bidest.	:	10 μ l
ATP	:	10 μ l
³² P-ATP	:	2 μ Ci
<u>Kinase</u>	:	<u>50 μl</u>
Gesamtvolumen	:	125 μ l

Nach 5-minütiger Inkubationszeit wurden vom Gesamtansatz jeweils 50 μ l entnommen und mit 50 μ l SDS-Probenpuffer für die SDS-PAGE versetzt. Eine Probe wurde vor der Zugabe des SDS-Probenpuffers mit 1% (w/w) Trypsin für 2 min., eine weitere Probe mit 10% (v/v) für 15 min. bei 20°C inkubiert.

Die Versuchsansätze wurden in zwei 15%igen Polyacrylamidgelelen aufgetrennt. Ein Gel wurde zur Autoradiographie 2 Wochen auf Röntgenfilm mit Verstärkerfolie aufgelegt.

Das andere Gel wurde zunächst mit Coomassie angefärbt, entfärbt und anschließend der Silberfärbung (nach Ansorge) unterzogen.

Die restlichen 75 μ l des Gesamtansatzes wurden auf Filterblättchen mit 15% TCA für 15 min. fixiert, 3 x 20 min. mit 15% TCA und zuletzt 30 min. mit Ethanol/Ether gewaschen. Anschließend wurde der Einbau von ³²P im Szintillationszähler gemessen.

3.6.2. Standardansatz zur Autophosphorylierung

Folgende Standardbedingungen wurden gewählt:

Tricin pH 7.8	:	10	mM
Manganchlorid	:	25	mM
Histon III S	:	30	µg
ATP	:	10	µM
³² P-ATP	:	20	µCi
Phytochrom	:	1 - 2 µg 124 kDa-Phytochrom in P _r - und P _r -Form in 10 mM Tricin pH 7.8	

Die Inkubation erfolgte für 30 min. bei 30°C im Wasserbad und unter grünem Sicherheitslicht.

Die Inkubationsansätze wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt und in 10%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Gele wurden anschließend nach Coomassiefärbung und Entfärbung über Nacht bei -70°C auf Röntgenfilm mit Verstärkerfolie aufgelegt.

3.7. Versuche zur Kristallisation von Phytochrom

3.7.1. Präparation der Proteinproben

Gereinigtes Phytochrom befindet sich normalerweise in einem Puffer aus 10 mM KPP, 5 mM EDTA, 14 mM 2-ME pH 7.8.

Zumeist wurde 5% Glycerin zur Stabilisierung des Proteins während der Aufbewahrung im Eisschrank hinzugefügt.

Da sowohl EDTA als auch Glycerin sich störend auf das Kristallisationsvermögen von Proteinen auswirken, wurden die Proben (jeweils ca. 500 µl) je nach Bedarf gegen 1000 ml 10 mM KPP, 2 mM DTT pH 7.5 und pH 8.0 bzw. 2 mM Hepes, 2 mM DTT pH 7.5 und pH 8.0 für mindestens 24 h dialysiert.

Nach der Dialyse wurden die Proben in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 2 min. bei maximaler Geschwindigkeit zur Abtrennung eventueller unlöslicher Bestandteile abzentrifu-

giert und nach Bedarf saturierend mit HR oder DR belichtet.

3.7.2. Kristallisationsmedien

Folgende Stammlösungen wurden angesetzt:

- 80% Ethanol p.A.
- 20% PEG in 10 mM Tris pH 7.5 und pH 8.0
- 20% PVP 40 in 10 mM Tris pH 7.5 und pH 8.0
- 2 % PVP 40 in 10 mM Tris pH 7.5 und pH 8.0
- 1 M Tris pH 7.5 und pH 8.0
- 3 M Ammoniumsulfat, 30 mM KPP pH 6.0
- 3 M Ammoniumsulfat, 30 mM KPP pH 7.0
- 3 M Ammoniumsulfat, 30 mM KPP pH 8.0
- 3 M Ammoniumsulfat, 30 mM KPP pH 9.0
- 3 M Ammoniumsulfat, 0.1 M Glycin pH 10.0
- 1 M Trinatriumcitrat pH 6.0
- 1 M Trinatriumcitrat pH 7.0
- 1 M Trinatriumcitrat pH 8.0
- 1 M Trinatriumcitrat, 0.1 M Glycin pH 9.0
- 1 M Trinatriumcitrat, 0.1 M Glycin pH 10.0

3.7.3. Kristallisationsansatz

Zur Anwendung kam die Methode der "Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen". Für die Kristallisationsansätze wurden runde Schalen ($d = 7.3$ cm) mit abnehmbarem Deckel verwendet (Abb. 1 a und b). Schalen, Deckel und Kristallisationsbrücken aus Plexiglas sind ein Geschenk von Prof. Huber, MPI für Biochemie, Martinsried, wo diese in eigener Werkstatt hergestellt werden.

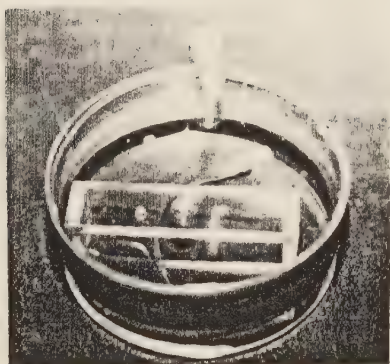


Abb. 1 a:
Kristallisationsansatz

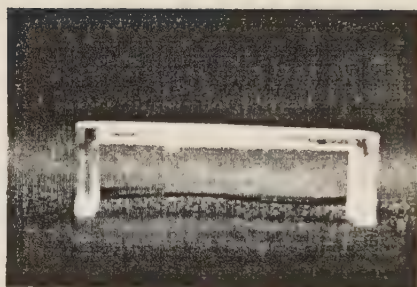


Abb. 1 b:
Kristallisationsbrücke
mit hängendem Tropfen

In dem Deckel befand sich ein mit einem Gummistopfen verschließbares rundes Loch ($d = 5 \text{ mm}$), durch das Manipulationen am Kristallisationsmedium vorgenommen werden konnten.

Die Kristallisationsansätze von P_1 und P_2 wurden unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt.

Die Unterseite der Kristallisationsbrücken müssen mit einem hauchdünnen Siliconfilm überzogen werden, um einen möglichst runden Tropfen zu erhalten. Darauf wird nun vorsichtig ein $10 \text{ } \mu\text{l}$ großer Tropfen der Phytochromlösung pipettiert. Anschließend gab man mit einer Pipette $2 \text{ } \mu\text{l}$ des Kristallisationsmediums auf den Proteintropfen, ohne dessen Form zu beschädigen.

Mit einer raschen Drehung der Brücke stellte man diese auf den Boden der Schale, in der sich 5 ml des Kristallisations-

mediums befanden.

Die Schale wurde geschlossen und die Kontaktstelle zwischen Schale und Deckel mit Parafilm oder Klebeband abgedichtet, um eine ungestörte Gasphasendiffusion zu gewährleisten.

Ebenso wurde die Öffnung im Deckel mit einem Gummistopfen fest verschlossen. Der Ansatz wurde bei RT mit Tüchern bedeckt (verhindert Anlaufen der Schalen) und bei 4°C im Kühlraum stehengelassen.

Nach 3 - 4 Tagen wurden die Schalen unter dem Mikroskop ausgewertet und nach Bedarf weitermanipuliert.

Das Ankonzentrieren des Kristallisationsmediums im Tropfen wurde so durchgeführt, daß durch die Öffnung im Schalendeckel durch Zugabe einer bestimmten Lösung z.B. die Ionenkonzentration oder der pH-Wert des Kristallisationsmediums auf dem Schalenboden verändert werden konnte.

4. Isolierung von Phytochrom

4.1. Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Etiolierte Keimlinge besitzen ca. 20 - 100 mal mehr Phytochrom als grüne Pflanzen (Pratt L. H., 1982).

Da Phytochrom in etioliertem Hafer vergleichsweise besonders angereichert ist, wo es ca. 0.5% des löslichen Proteins (Quail et al., 1983) darstellt, dienten etiolierte Haferkeimlinge (Avena sativa L., Var. Pirol, BayWa München) als Pflanzenmaterial.

Es wurde ungebeiztes Samenmaterial (ohne Vorquellen) verwendet.

Zur Keimung des Saatgutes wurden je 3 l Vermiculith (Fa. Horber Baustoffe, Augsburg) in Plastikschalen (60 x 50 cm) mit 2 l Leitungswasser vermischt und darauf 750 - 1000 g des Saathaifers gleichmäßig ausgebreitet.

Die Plastikschalen wurden anschließend mit Lochplatten abgedeckt und das Saatgut in einem Brutschrank bei konstant 26°C

und maximaler Luftfeuchtigkeit im Dunkeln zum Keimen gebracht.

Nach $3\frac{1}{2}$ Tagen wurden die Keimlinge unter grünem Sicherheitslicht mit einer Spachtel über der Lochplatte abgeschnitten. Bei normaler Keimrate konnten durchschnittlich 100 g etioliierte Keimlinge pro Saatschale geerntet werden.

Die Keimlinge wurden entweder sofort verarbeitet oder konnten im Dunkeln bei 4°C unbelichtet mehrere Tage aufbewahrt werden.

4.2. Sicherheitsvorkehrungen

Sämtliche Isolierungs- und Reinigungsschritte wurden unter grünem Sicherheitslicht, das Phytochrom nur minimal absorbiert, durchgeführt.

Zur Senkung proteolytischer Aktivitäten endogener Proteasen wurde ausschließlich im Kühlraum bei ca. 4°C gearbeitet.

Bei der Bereitung des Rohextrakts, der ersten Ammoniumsulfatfällung und der Resuspension dieses Präzipitats wurde der Serinproteaseinhibitor PMSF hinzugefügt (Vierstra et al., 1982).

Als Antioxidantien dienten bei der Rohextraktgewinnung Na_2SO_3 , bei allen weiteren Reinigungsschritten 2-ME.

Zur längeren Aufbewahrung von Phytochromproben wurden diese mit Glycerin versetzt (Endkonzentration = 5% v/v) und bei -30°C eingefroren.

4.3. Photometrische Bestimmung der Phytochromkonzentrationen und Reinheitsgrad

Der Phytochromgehalt einer Lösung wird in Phytochromeinheiten (= PE) pro ml Lösung angegeben.

Bei einem Molekulargewicht des nativen Phytochroms von 124000 Da und einem molaren Extinktionskoeffizienten von 1.21×10^4 (Litts et al., 1983) bzw. 1.32×10^4 (Lagarias et al., 1987) entspricht 1 PE der Phytochrommenge von ca.

1 mg / ml in der P_r -Form, die in 1 ml Lösung bei der Schichtdicke 1 cm eine Extinktion bei $\lambda = 666$ nm von 1 besitzt. Die Phytochrombestimmung bei $\lambda = 666$ nm in stark streuenden, grob angereicherten Phytochromlösungen erfolgte mit Hilfe der Messung der Absorptionsdifferenz $\Delta E = E_{666} - E_{730}$ jeweils nach saturierender Belichtung der Probe mit HR (660nm) bzw. DR (730 nm). Die annähernde P_r -Absorption bei 666 nm erhält man dann aus der Differenz der gemessenen Werte.

$$\Delta \Delta E = \Delta E_{Pr} (E_{666} - E_{730})_{\text{belichtet}} - \Delta E_{Pr} (E_{666} - E_{730})_{\text{nicht belichtet}}$$

Als Reinheitskriterium von Phytochromproben diene das Absorptionsverhältnis $E_{666} : E_{730}$ (SAR = specific absorbance ratio), das sich bei reinem nativem Phytochrom dem Wert 1 nähert. Aus den Werten der unter 1.1. beschriebenen Belichtungseinrichtung ergab sich für die sättigende Photokonversion nativen Phytochroms von P_r zu P_{fr} eine Belichtungszeit von 40 sec., von P_{fr} zu P_r eine Belichtungszeit von 70 sec.

4.4. Reinigung von Phytochrom

Die primären Isolierungsschritte bis hin zur HA-Säule entsprechen weitgehend der Methode von Vierstra und Quail (1983).

Die frischgeernteten Haferkeimlinge werden im Kühlraum unverzüglich auf 4°C abgekühlt, wo sie unproblematisch und insbesondere ohne Verlust an Phytochrom bis zu einer Woche aufbewahrt werden können.

Unmittelbar vor Beginn der Aufarbeitung werden die abgekühlten Keimlinge saturierend mit HR-Licht von 660 nm ($5 \text{ J} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) bestrahlt.

Es ist seit langem bekannt, daß die de-novo in etiolierten Pflanzen gebildete P_r -Form gegen proteolytischen Angriff weitaus labiler ist als die P_{fr} -Form (Vierstra et al.,

1982). Daher wird als weitere Sicherheitsmaßnahme Phytochrom durch HR-Belichtung der im Dunkeln gewachsenen Keimlinge in die P_{1r} -Form umgewandelt und aufgereinigt.

4.4.1. Extraktion

Das abgekühlte Pflanzenmaterial wird in einem vorgekühlten "Waring-Blendor" mit 0.75 l Extraktionspuffer pro kg Frischgewicht Keimlinge zunächst portionsweise 10 sec. bei "low speed", dann 1 min. 30 sec. bei "high speed" homogenisiert.

Extraktionspuffer

50 % Ethylenglycol

100 mM Tris / HCl pH 8.3

140 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

10 mM Na_4EDTA

20 mM Na_2SO_4

4 mM PMSF

Zur Abtrennung gröberer Zellbestandteile wird der Rohextrakt mit Hilfe einer gewöhnlichen Wäscheschleuder durch eine Lage Leinen und feines Nylongewebe (0.075 mm Maschenweite) zentrifugiert.

4.4.2. PRI-Fällung

Nukleinsäuren, Pektine und saure Proteine werden nun durch Zugabe von 10 ml einer 10%igen Polyethyleniminlösung pH 7.8 pro 1 Rohextrakt präzipitiert. Man läßt 10 min. rühren und zentrifugiert 20 min. bei 19000 g ab. Die Zentrifugationsüberstände werden vereinigt und der Gehalt an Phytochrom durch Differenzspektroskopie bestimmt.

4.4.3. Ammoniumsulfatfällung

Phytochrom wird nun durch Zugabe von 2 mM PMSF und 250 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pro l Rohextrakt (= 42%ige Sättigung) innerhalb von 20 min. ausgefällt. Während der Fällungsreaktion muß der pH-Wert des Rohextrakts kontrolliert und gegebenenfalls mit 3 M Trislösung auf pH 7.8 gebracht werden.

Bisweilen zeigte sich, daß durch den zellulären Gehalt an organischen Säuren der pH-Wert des Extraktionspuffers von pH 8.3 auf Werte unter pH 7.5 fiel. Die Präzipitation mit Ammoniumsulfat, einem sauren Salz, führt zudem zu einer Senkung des pH-Wertes.

Nach 40-minütigem Rühren wird bei 19000 g 30 min. abzentrifugiert.

4.4.4. Resuspendieren

Die Präzipitate, die das ausgefällte Phytochrom beinhalten, werden nun mit 4.5 ml Resuspensionspuffer pro PE im Rohextrakt resuspendiert.

Resuspensionspuffer

25 % Ethylenglycol

50 mM Tris / HCl pH 7.8

5 mM Na_2EDTA

14 mM 2-ME

2 mM PMSF

Die resuspendierten Präzipitate wurden vereinigt, 10 min. gerührt und anschließend bei 42000g 20 min. abzentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt (= HA-Auftrag) und der Phytochromgehalt spektroskopisch bestimmt.

Die phytochromhaltige Proteidlösung, die auch noch Polyphenole und Xanthophylle enthält, wurde nun auf eine HA-Säule aufgetragen, deren Behandlung von der Methode nach Vierstra

und Quail (1983) abweicht.

4.4.5. Chromatographie an Hydroxylapatit

Das in einigen bisher beschriebenen Isolierungsmethoden (Vierstra et al., 1983) verwendete HA wurde zumeist nach der Methode von Siegelman et al. (1965) präpariert. Im Gegensatz dazu verwendeten wir kommerzielles HA (Fa. Calbiochem). Zum Einsatz kamen die Qualitätsnormen "fast flow" und "high resolution".

Bei einem Säulenauftrag von durchschnittlich 40 - 60 PE wurden 150 - 175 ml HA pro Säulenfüllung verwendet.

Neu verwendetes HA wurde vor der Säulenfüllung zunächst zur Entfernung feinsten Bestandteile mit ca. 40 l H₂O bidest. gewaschen.

Bereits gebrauchtes HA, das 4 - 5 mal benützt werden kann, wurde in der Säule durch Waschen mit 2 - 3 Säulenvolumina an 300 mM KPP pH 7.8 und anschließend mit 1 l 3 M KCl regeneriert. Durch gründliches Waschen mit H₂O bidest. (ca. 40 l) wird die hohe Ionenkonzentration ausgewaschen und das HA kann wieder verwendet werden.

Für diese Adsorptionschromatographie wurde eine Säule (Fa. Bio-Rad) mit $d = 5$ cm und einer Betthöhe von $h = 8$ cm verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug kontinuierlich 2 ml / min.

Folgende Puffer wurden verwendet:

Aquilibrierpuffer: 25 % Ethylenglycol

50 mM Tris / HCl pH 7.8

5 mM Na₂EDTA

14 mM 2-ME

Waschpuffer : 50 mM Tris / HCl pH 7.8

5 mM Na₂EDTA

14 mM 2-ME

Elutionspuffer : 5 mM KPP pH 7.8

5 mM Na₂EDTA

14 mM 2-ME

200 mM KPP pH 7.8

5 mM Na₂EDTA

14 mM 2-ME

Vor dem Probenauftrag wurde die Säule mit Äquilibratorpuffer so lange vorbehandelt (am besten über Nacht mit Sicherheits-schleife) bis das Eluat den pH-Wert von 7.8 erreicht hatte. Nach erfolgtem Probenauftrag wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen.

Die Elution von Phytochrom wurde anschließend mit einem linearen Gradienten von 5 - 200 mM KPP pH 7.8 durchgeführt (Elutionsdiagramm siehe Abb. 2).

Die Gradientenelution erwies sich auch als effizienter und zeitsparender als eine stufenweise Elution mit KPP-Puffer steigender Molarität (z.B. 5 mM, 25 mM, 100 mM KPP) bzw. die Elution mit einem KPP-Puffer definierter Molarität.

Sämtliche phytochromhaltige Fraktionen mit einer $E_{280}/E_{260} > 0.08$ wurden vereinigt (= HA-Pool) und der Phytochromgehalt des HA-Pools spektroskopisch bestimmt.

Zur Aufkonzentrierung wurde Phytochrom nun durch Zugabe von 0.65 ml / ml HA-Pool eines 3.3 M Ammoniumsulfat-Fällungspuffers (= 42%ige Sättigung), der mit 50 mM Tris auf pH 7.8 eingestellt war, quantitativ präzipitiert.

Nach 15 min. Rühren wurde bei 42000 g abzentrifugiert.

Auf dieser Stufe der Aufarbeitung kann Phytochrom zur zeitlich verzögerten Weiterbearbeitung nach Aufnahme des Pellets in Resuspensionspuffer (3.3 ml / PE bezogen auf den PE-Gehalt des HA-Pools) problemlos mehrere Monate bei -30°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

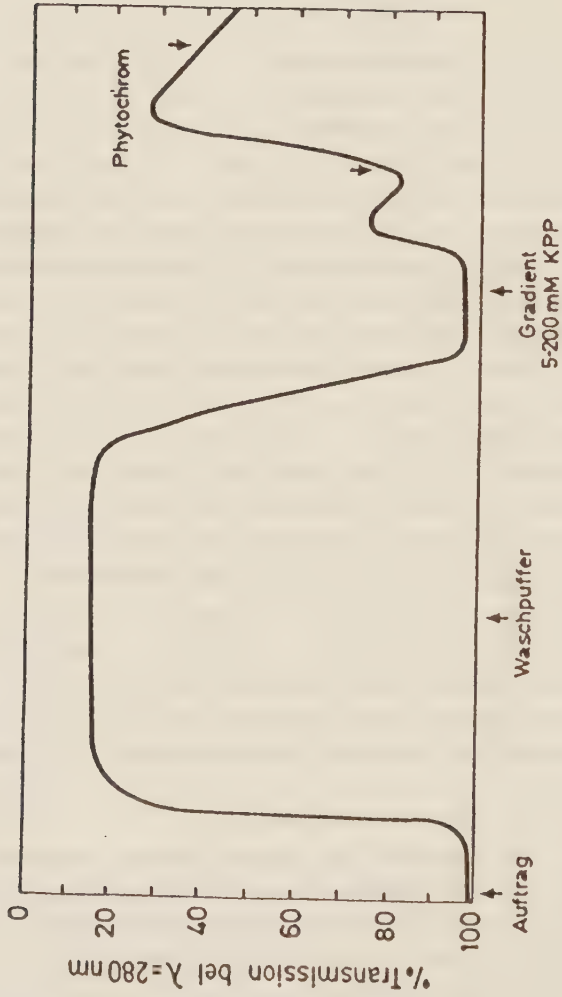


Abb. 2: HA-Elutionsdiagramm mit linearem Gradienten 5-200 mM KPP, 5 mM Na_4EDTA , 14 mM 2-ME pH 7.8

4.4.6. Weiterreinigung über differentiell^es Solubilisierungsvermögen von Phytochrom

Ziel der Bemühungen war es mit möglichst kleinen Volumina an konzentrierten Phytochromlösungen mit Hilfe weniger Wasch- und Präzipitierungsschritte auf einfache, schnelle und schonende Art Phytochrom selektiv in nicht-degradiierter Form mit hoher reproduzierbarer Ausbeute aufzureinigen. Das differentielle Löslichkeitsvermögen von nativem Phytochrom in KPP-Puffern unterschiedlicher Molarität bei pH 7.8 sollte daher ein geeigneter Weg sein.

Verwendet wurden folgende Puffer:

10 mM KPP pH 7.8, 5 mM Na₂EDTA, 14 mM 2-ME

100 mM KPP pH 7.8, 5 mM Na₂EDTA, 14 mM 2-ME

Sämtliche Arbeitsschritte wurden im 20 min. Rhythmus vollzogen, einschließlich der Zentrifugationsschritte bei 46000 g. Für alle Ansätze wurde das Ammoniumsulfatpräzipitat von Phytochrom aus dem HA-Pool verwendet.

Jeder Ansatz wurde vor und nach einem Reinigungsschritt spektroskopisch auf Phytochromgehalt und auf Reinheitsindex (SAR) im Überstand geprüft. Aliquots wurden jeweils entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Effizienz und das Molekulargewicht der verschiedenen Kontaminationsproteine zu bestimmen. Aus den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten, das Ammoniumsulfatpräzipitat des HA-Pools mit 10 mM und 100 mM KPP-Puffer und Puffermengen von 0.5 - 1 ml / PE zu solubilisieren bzw. die phytochromhaltigen Präzipitate der Solubilisierungsschritte wiederum mit 10 mM und 100 mM KPP-Puffer zu lösen, ergab sich eine einzige Kombinationsmöglichkeit mit hoher Ausbeute und Reinigungseffizienz:

Das Ammoniumsulfatpräzipitat des HA-Pools wird mit 0.65 ml 10 mM KPP / PE im HA-Pool resuspendiert. Nach 20 min. Rühren wird 20 min. bei 46000 g abzentrifugiert und der Phytochrom-

gehalt des Überstandes (ÜS 1) gemessen.

Das Präzipitat, das noch das meiste Phytochrom beinhaltet, wird nun mit 0.85 ml 100 mM KPP / PE im Präzipitat resuspendiert. Nach 20 min. Rühren wird 20 min. bei 46000 g abzentrifugiert und der Phytochromgehalt des Überstandes (ÜS 2) bestimmt.

Das Präzipitat wird nun mit 0.9 ml 10 mM KPP / PE im Präzipitat resuspendiert. Nach 20 min. Rühren wird erneut 20 min. bei 46000 g abzentrifugiert. Das meiste Phytochrom befindet sich nun im Überstand (ÜS 3) mit einem durchschnittlichen Reinheitsgrad (SAR) von bereits 0.65 - 0.87.

4.4.7. Präzipitierungsversuche von Phytochrom

Zur Weiterreinigung des ÜS 3 sollte ein selektives Präzipitierungsreagenz für natives Phytochrom gefunden werden. Phytochromlösungen des ÜS 3 wurden dazu mit steigenden Konzentrationen von 100 mg - 25 g PEG 6000 bzw. PVP 40000 pro 100 ml Lösung versetzt. Nach 20 min. Rühren wurde jeweils 20 min. bei 46000 g abzentrifugiert. Präzipitiertes Phytochrom wurde mit 1 ml 10 mM KPP / PE im Präzipitat solubilisiert. Nach 20 min. Rühren wurde wieder 20 min. bei 46000 g abzentrifugiert. Der Phytochromgehalt und der Reinheitsindex wurden erneut bestimmt.

Während mit PEG keine weitere Reinigung erzielt werden konnte, erwies sich die Präzipitierung mit PVP 40000 als sehr effektiver Reinigungsschritt. Bei Verwendung von 15g PVP 40000 pro 100 ml Lösung konnte Phytochrom quantitativ ausgefällt werden. Reinheitsindices (= SAR) bis zu 0.99 wurden erreicht.

4.5. Löslichkeit von nativem Phytochrom

Ausgehend von Phytochromproben (SAR: 0.6 - 0.9) in 10 mM KPP pH 7.8, 5 mM Na₂EDTA, 14 mM 2-ME mit einem Phytochromgehalt von 1 mg / ml (= 1 PE) wurde die Löslichkeit von nativem Phytochrom nach Erhöhung des KPP-Gehaltes bzw. in Gegenwart von 2% Sättigung mit Ammoniumsulfat überprüft.

Durch Zugabe von 0.5 M KPP pH 7.8, 5 mM Na₂EDTA, 14 mM 2-ME wurde der KPP-Gehalt der Proben auf 25 mM, 50 mM und 100 mM KPP erhöht. Ein weiterer Ansatz wurde mit 0.02 ml 3.3 M Ammoniumsulfat-Fällungspuffer / ml Lösung (= 2% Sättigung) versetzt. Nach 15 min. Rühren wurde 20 min. bei 46000g abzentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend spektroskopisch auf ihren Phytochromgehalt geprüft.

III. E R G E B N I S S E

1. Entwicklung einer einfachen und schnellen Isolierungsmethode von nativem 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer

Die ersten Isolierungsschritte der Reinigungsmethode von Vierstra und Quail (1983) bis zur Chromatographie von Phytochrom an Hydroxylapatit hatten sich als einfach, reproduzierbar und nicht allzu zeitintensiv bewährt. So wurden diese Reinigungsschritte als Basis zur Entwicklung einer vereinfachten und zeitsparenden Isolierungsmethode mit reproduzierbar hohen Ausbeuten verwendet.

1.1. Chromatographie von Phytochrom an Hydroxylapatit

Entsprechend der Methode von Vierstra und Quail (1983) wurde Phytochrom säulenchromatographisch an Hydroxylapatit gebunden. Die Elution von Phytochrom erfolgte nun aber nicht mit einem Phosphatpuffer definierter Molarität, sondern mit einem linearen Gradienten von 5 - 200 mM KPP pH 7.8. Die Gradientenelution erbrachte bei guter Reinigungseffizienz in angemessener Zeit eine durchschnittliche Ausbeute von mindestens 70 % (siehe Tab.1). Die Elution mit reinen Phosphatpuffern erscheint auch zuverlässiger als die von Datta und Roux (1985) beschriebene Gradientenelution von 50 mM Tris zu 100 mM KPP.

Tab. 1: Reinigung und Ausbeute von Phytochrom aus 3 kg Haferkeimlingen

	Volumen (ml)	E'''''	PE	SAR	Ausbeute (%)	Durchschnittlicher Zeitaufwand (h)
pEI-Überstand	3750	0.02	75	n. b.	100	2
HA-Auftrag	330	0.16	52.5	n. b.	70	5
HA-Pool	225	0.16	36	0.10 - 0.15	49	12
(NH ₄) ₂ SO ₄ -Präzipit. nach Waschen mit Phosphatpuffern	23	0.96	22	0.65 - 0.87	30	14.5
PVP-Präzipitation	22	0.85	18.5	0.90 - 0.99	25	16

n. b. = nicht bestimmt

1.2. Weiterreinigung von Phytochrom durch spezifische Wasch- und Präzipitationsschritte

Viele der gewöhnlichen Isolierungsschritte bei einer Aufreinigung eines Proteins, wie zum Beispiel Adsorptionschromatographie, Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie, erfordern einen relativ großen Zeitaufwand und erbringen oft Proteinlösungen in starken Verdünnungen. Auf der anderen Seite ist es schonender und zeitsparender mit konzentrierten Proteinlösungen zu arbeiten. Aus diesen Gründen wurden einfache und schnelle Präzipitierungsreaktionen, sowie die differentielle Löslichkeit von Phytochrom in Puffern unterschiedlicher Molarität bei gleichzeitiger Abtrennung von Kontaminationsproteinen untersucht.

1.2.1. Löslichkeit von Phytochrom

Aus den unter II.4.5. beschriebenen Versuchen, bei denen die Molarität des Phosphatpuffers bei pH 7.8 sukzessiv von 10 mM auf 25 mM, 50 mM und 100 mM KPP erhöht wurde, zeigte sich eine deutliche Abnahme der Löslichkeit von Phytochrom (Tab. 2).

Eine überraschend geringe Löslichkeit von nativem Phytochrom in 10 mM KPP-Puffer zeigte sich auch nach 2%iger Sättigung mit Ammoniumsulfat. Circa 90% natives Phytochrom präzipitierten (Tab. 2). Dieses Ergebnis ist deswegen überraschend, da normalerweise natives Phytochrom durch 42%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat präzipitiert wird. Die geringe Löslichkeit von nativem Phytochrom in 10 mM KPP-Puffer in Gegenwart einer 2%igen Sättigung an Ammoniumsulfat erklärt auch den Effekt, daß Phytochrom nach Präzipitation des HA-Pools mit 42%iger Ammoniumsulfatsättigung und Resuspension des Pellets mit 0.65 ml 10 mM KPP-Puffer / PE erneut präzipitiert, da sich im Präzipitat der Ammoniumsulfatfällung noch ca. 2% Ammoniumsulfat befinden.

1.2.2. Präzipitationsversuche von nativem Phytochrom

Während Präzipitationsversuche mit der Polyhydroxyverbindung PEG 6000 unzureichende Resultate ergaben, wurden mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) 40000 ausgezeichnete Ergebnisse erzielt. Natives Phytochrom mit einem SAR > 0.2 kann mit einer Konzentration von 15 g PVP / 100 ml Lösung quantitativ präzipitiert werden. Nach Solubilisierung des PVP-Präzipitats in 1 ml 10 mM KPP-Puffer pH 7.8 / PE ergab sich eine hohe Reinigungseffizienz (Tab.1).

Tab. 2: Löslichkeit von .124 kDa-Phytochrom aus Hafer. Die Werte entsprechen den Phytochromkonzentrationen im Überstand nach der Veränderung der Ionenkonzentration von reinem Phytochrom in 10 mM KPP-Puffer und einem ursprünglichen Phytochromgehalt von 1 mg / ml Lösung nach 20 min. Inkubation und 20 min. Zentrifugation bei 46000 g

Solvens	Phytochromkonzentration [Einheiten pro ml]	
	P _r -Form	P _{fr} -Form
Mit Ammoniumsulfat		
10 mM KPP pH 7.8 + 2%ige Sättigung	0.14	0.09
Ohne Ammoniumsulfat		
25 mM KPP pH 7.8	0.26	0.50
50 mM KPP pH 7.8	0.16	0.35
100 mM KPP pH 7.8	0.10	0.14

1.3. Kombination der Löslichkeits- und Präzipitationseigenschaften von 124 kDa-Phytochrom

Machte man sich die unter III.1.2.1. und 1.2.2. beschriebenen Löslichkeits- und Präzipitationseigenschaften zunutze, so ergab sich die in Abb. 3 formulierte Reinigungsmethode (siehe auch II.4.) für natives 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer.

Von entscheidender Bedeutung ist, daß die Reihenfolge der diversen Wasch- und Präzipitationsschritte exakt eingehalten werden muß. Veränderungen in den Molaritäten der KPP-Puffer, in der Reihenfolge der Waschschrirte, sowie geänderte Zentrifugationsbedingungen führen zum Mißlingen der Methode.

1.4. Reinheit des isolierten 124 kDa-Phytochroms

Die Reinheit des isolierten Phytochroms wurde sowohl spektroskopisch, als auch gelelektrophoretisch überprüft. Weiterhin wurden verschiedene Eigenschaften der gereinigten Phytochromlösungen überprüft.

1.4.1. Spektroskopische Charakterisierung

In Abb. 4 ist ein charakteristisches Absorptionsspektrum von gereinigtem nativem Phytochrom aus etioliertem Hafer mit einem SAR von 0.99 zu sehen. Die durchgezogene Linie zeigt die P_r -Form nach saturierender DR-Belichtung von 730 nm, die unterbrochene Linie die P_r -Form nach saturierender HR-Belichtung von 660 nm.

Ein Qualitätsmerkmal für die spektroskopische Reinheit von nativem Phytochrom ist das Verhältnis $E_{660} : E_{730}$ (= SAR). Je mehr es sich dem Wert 1 nähert, desto reiner werden die Phytochromlösungen betrachtet.

Ein weiteres Merkmal ist die geringe Absorption der Phyto-

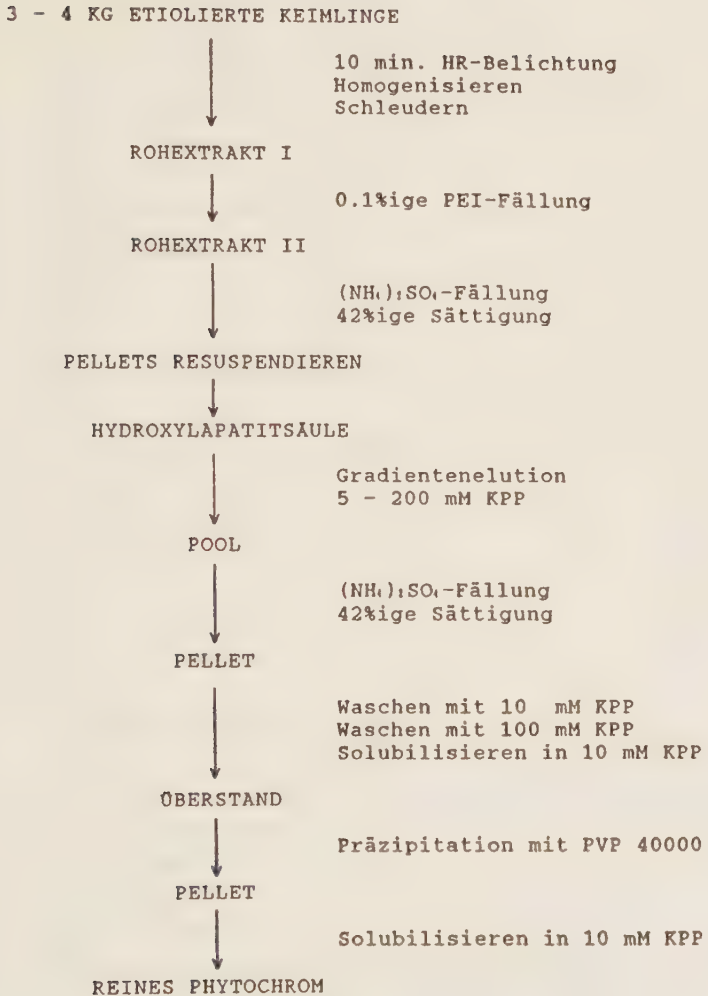


Abb. 3: Isolierungsdiagramm von 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer

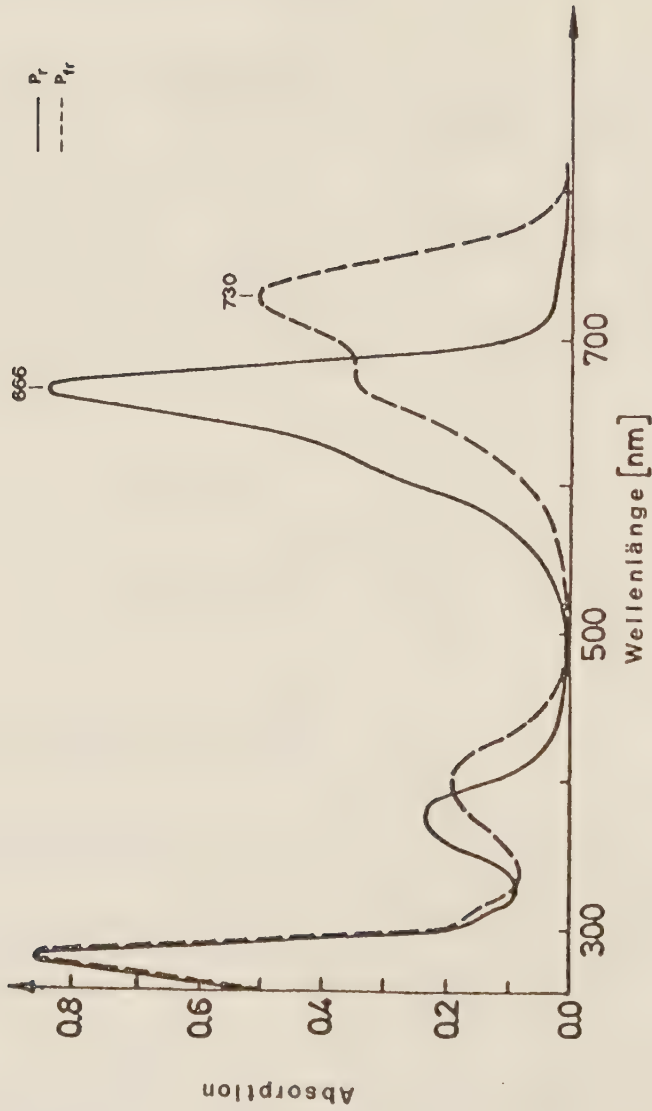


Abb. 4: Absorptionsspektrum von 124 kDa-Phytochrom aus etiolierendem Hafer in 10 mM KPP, 5 mM Na₂EDTA, 14 mM 2-ME pH 7.8 nach saturierender HR- und DR-Belichtung mit einem SAR = 0.99

chromlösungen bei $\lambda = 320$ nm. Hohe Absorption in diesem Wellenlängenbereich zeigt kovalente Modifikation von Proteinen mit oxidierten Phenolen an, wie zum Beispiel auch von Phytochrom (Litts et al., 1983). Aufgrund der geringen Absorption bei dieser Wellenlänge von Phytochrom, das nach der beschriebenen Methode isoliert wurde, ist mit einer derartigen Modifikation nicht zu rechnen.

In seinen spektralen Eigenschaften entspricht unser Produkt den von Quail et al. (1983) beschriebenen Werten für natives Phytochrom:

$P_r \lambda_{\text{max.}}$	666 nm + 379 nm
$P_{ir} \lambda_{\text{max.}}$	730 nm + 400 nm
$E''_{\text{irr.}} / E''_{\text{schütter}}$	1.45
$E''_{\text{irr.}} / E'_{\text{irr.}}$	0.58

1.4.2. Elektrophoretische Charakterisierung

Betrachtet man die verschiedenen Reinigungsschritte nach der HA-Säule und das gereinigte Endprodukt nach Auftrennung von Aliquots der jeweiligen Schritte mit PAGE (Abb. 5), ist Folgendes zu erkennen :

Beim ersten Waschschrift mit 10 mM KPP-Puffer sind im Gel (Abb. 5, Spur a) nach Anfärbung mit Coomassie über 40 Banden zu sehen, die über den gesamten Molekulargewichtsbereich verteilt sind. Das Absorptionsspektrum dieser Fraktion gleicht dem Spektrum des "Großen Phytochroms" mit 118/114 kDa. Dies ist ein Hinweis darauf, daß degradierte Phytochromproben bei diesem Reinigungsschritt entfernt werden.

Der zweite Waschschrift mit 100 mM KPP-Puffer bringt im

Überstand neben geringen Mengen 124 kDa-Phytochrom, das in diesem Puffer weniger gut löslich ist (siehe auch Tab. 2), vor allem ein Protein mit ca. 180 kDa und ein 60 kDa-Protein (Abb. 5, Spur b), das auch im ersten Waschprozeß in relativ hoher Quantität bereits im Überstand auftritt. Daß es sich bei diesem 60 kDa-Protein nicht um das sog. "Kleine Phytochrom" handelt, wurde durch Western-Blotanalyse mit monoklonalen Antiphytochrom-Antikörpern nachgewiesen (siehe auch III.1.6.).

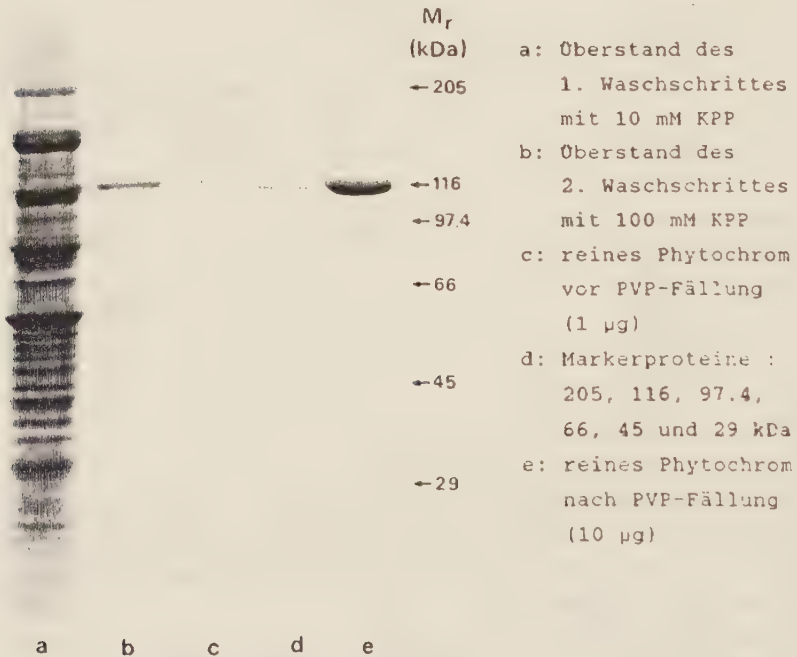


Abb. 5: Darstellung verschiedener Reinigungsschritte
Auftrennung der Proteine im 7.5 - 15% Gradientengel

Daß es sich bei dem Endprodukt um das reine, native 124 kDa-Phytochrom handelt, zeigen die Spuren c und e (Abb. 5). Ver-

schiedene Konzentrationen - Spur c: 1 μg , Spur e: 10 μg - dokumentieren, daß zum einen tatsächlich das 124 kDa-Phytochrom vorliegt und zum anderen ein hoher Reinheitsgrad (Spur e) durch das Fehlen weiterer Proteinbanden zu erkennen ist.

1.4.3. Eigenschaften gereinigter Phytochromlösungen

Natives Phytochrom kann in Gegenwart von 2% (v/v) Glycerin bei -30°C im Gefrierschrank über mehrere Jahre (z.Zt. 2 Jahre seit den ersten Isolierungen nach eigener Methode) aufbewahrt werden. Auch mehrmonatiges Inkubieren im Kühlschrank bei 4°C , mehrwöchiges Inkubieren bei Raumtemperatur oder mehrstündiges Inkubieren bei 40°C sind ohne Einfluß auf die Qualität der Proteinlösung.

Die größtmögliche Proteinkonzentration an reinem 124 kDa-Phytochrom in KPP-Puffern pH 7.8 betrug 1.05 mg / ml Lösung. In 2 mM Hepes-Puffer pH 7.8 konnten bis zu 1.15 mg / ml Lösung als stabile Lösung erreicht werden.

Konzentrierungsversuche reiner Phytochromproben in KPP-Puffern und in Hepes-Puffern verschiedener Molarität zeigten, daß natives Phytochrom bei Proteinkonzentrationen über 1.2 mg / ml Lösung durch starkes Aggregationsverhalten ausfällt.

Gereinigte Phytochromproben sind proteasefrei. Nach Selbstinkubation über mehrere Tage und Wochen waren im Polyacrylamidgel keine Degradierungsprodukte zu erkennen. Auch blieben die Spektraleigenschaften vollkommen unverändert. So gelang es mit dieser Methode insbesondere die von Rice und Briggs (1972) beschriebene Protease, die relativ stark an Phytochrom assoziiert ist, in den beiden Waschschritten mit 10 mM und 100 mM KPP-Puffer zu entfernen. Die Anwesenheit dieser Protease wurde durch Inkubation bei 20°C für 54 h von 1 PE gereinigtem Phytochrom in der P_r - und in der P_{fr} -Form mit 0.05 PE Waschüberstand 1 bzw. Waschüberstand 2 über-

prüft. Die Inkubation mit dem 10 mM Waschüberstand 1 erbrachte für die P_r -Form eine Degradation von ca. 65% 124 kDa-Phytochrom zu 118 / 114 kDa-Phytochrom, mit dem 100 mM Waschüberstand 2 noch Spuren degradierten Phytochroms. Unter diesen Bedingungen war kein proteolytischer Abbau der nativen P_r -Form feststellbar. Diese Beobachtung entspricht damit den Ergebnissen früherer Berichte (Vierstra et al., 1983, Litts et al. 1983, Kerscher, 1983).

1.5. Effizienz der Methode

Die Aufreinigung von nativem Phytochrom, von der Stufe des HA-Pools ausgehend, beträgt nur noch ca. 4 h (Tab. 1).

Die Endausbeute der Gesamtmethode beträgt durchschnittlich 25%, zum Teil bis zu 35%, bezogen auf den Phytochromgehalt im Rohextrakt nach der PEI-Fällung (Tab. 1).

So kann natives Phytochrom aus 3 - 4 kg etiolierten Haferkeimlingen innerhalb von 16 h mit einer reproduzierbaren Ausbeute von 25% isoliert werden (Tab. 1). Bei gleichzeitigem spektroskopischem Reinheitsindex $SAR = 0.90 - 0.99$ ist diese Methode mit den bis dato in der Literatur beschriebenen Isolierungsmethoden vergleichbar bzw. übertrifft diese noch (Tab. 3).

Tab.3: Vergleich diverser Isolierungsmethoden

Autoren	Zahl der Zen- fugations- schritte	Chromato- graphie- schritte	SAR	Ausbeute (%)
Eigenes Ver- fahren	9	1	0.99	25
Litts, Kelly, Lagarias (1983)	9	3	0.88	17
Vierstra, Quail (1983)	8	3	0.90-0.94	13
Datta, Roux (1985)	7	3	0.80-0.92	10
Chai et al. (1987)	6	2	0.98-1.13	22

Die Reduzierung der Isolierungsmethode auf nur noch einen Chromatographieschritt (HA-Säule), sowie wenige zeitsparende Präzipitations- und Solubilisierungsschritte bedeutet auch eine methodische Vereinfachung.

Der Verzicht auf Antikörpersäulen bei der Isolierung (Hunt und Pratt, 1979) sowie auf Chromatographie an Affi-Gel Blue (Vierstra und Quail, 1983, Smith und Daniels, 1981), bei der FMN als Elutionsmittel verwendet wird und FMN durch einen Energietransfer auf den Phytochromchromophor zu dessen Oxidation führen kann, zeigt weitere Vorteile auf.

Auch das Fehlen eines häufig angewendeten gelchromatographischen Reinigungsschrittes erspart neben Zeit insbesondere ein Verdünnen von Phytochromlösungen, wodurch bekannterweise die Denaturierung von Proteinen gefördert wird.

1.6. Charakterisierung eines 60 kDa-Kontaminationsproteins

Als ein wesentliches Begleitprotein wird im 1. und vor allem im 2. Waschschrift mit 100 mM KPP-Puffer ein 60 kDa-Protein (Abb. 5, Spur b) entfernt, das möglicherweise eine gewisse Affinität zu Phytochrom, vor allem in der P_r -Form, besitzt. Dieses 60 kDa-Protein läßt sich bei der Aufreinigung von Phytochrom in der P_r -Form nicht oder nur unzureichend weg-reinigen (Abb. 6).

Bei den Waschprozessen des Ammoniumsulfatpräzipitats von Phytochrom aus dem HA-Pool erhöht es das Löslichkeitsvermögen von Phytochrom in der P_r -Form gegenüber der P_r -Form. Dadurch reduziert sich die effektive Ausbeute an gereinigtem Phytochrom drastisch. Auch wird der normale Reinheitsgrad bei der Phytochromaufreinigung in der P_r -Form nicht erreicht.

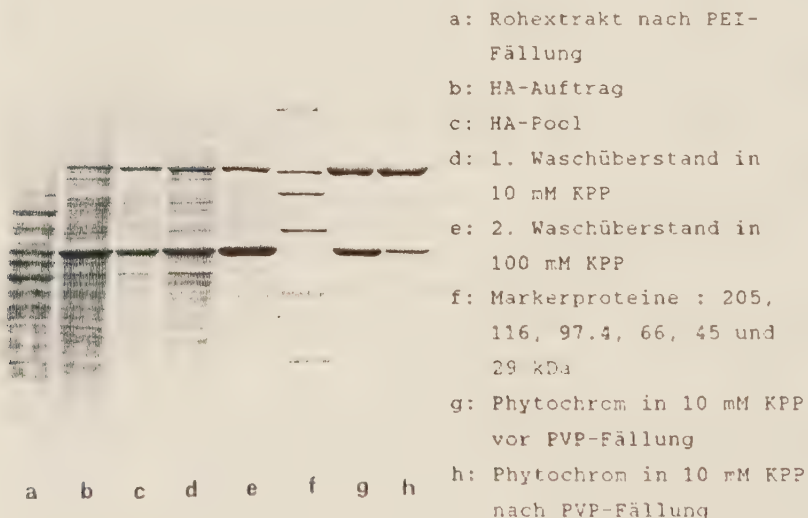


Abb. 6: Diverse Reinigungsschritte der Phytochromaufreinigung in der P_r Form. Auftrennung der Proteine im 7.5 - 15% Gradientengel

Daß es sich bei diesem 60 kDa-Protein nicht um das sog. "Kleine Phytochrom" handelt, wurde unter anderem durch Western-Blotanalyse mit monoklonalen Antiphytochrom-Antikörpern durch negative Reaktion ermittelt.

Inkubiert man gereinigte Phytochromproben, die noch mit diesem 60 kDa-Protein kontaminiert sind, mit Trypsin, so zeigt sich, daß auch nach längerer Inkubation dieses Protein gegen tryptischen Angriff stabil ist, während Phytochrom in kleinste Peptide gespalten wird.

Da dieses 60 kDa-Protein aber in solch hoher Quantität im Polyacrylamidgel zu sehen ist, liegt der Schluß nahe, daß es sich um verschiedene Proteine mit gleichem Molekulargewicht oder um ein oligomeres Protein mit der Monomergröße von 60 kDa handelt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung des 60 kDa-Proteins und anschließendem Elektroblob auf aktivierte Glasfaser wurde außerdem die aminoterminal Sequenz bestimmt. Sie lautet:

A L E S A

Der Vergleich mit gleichlautenden Proteinsequenzen über die NBRF-Datenbank ergab keine funktionellen oder evolutionären Hinweise auf Proteine mit homologer Sequenz.

2. Untersuchungen zur Primärstruktur von 124 kDa-Phytochrom

Nach Aufklärung der Chromophorstruktur der P_r-Form und der P_{fr}-Form von Phytochrom (Rüdiger et al., 1980, Lagarias und Rapoport, 1980, Rüdiger et al., 1983, Thümmler et al., 1983), sowie der Sequenz eines 11 Aminosäuren großen Chromopeptids (Lagarias und Rapoport, 1980), gelang es Hershey et al. (1985) über den Weg der Klonierung von c-DNA und genomischer DNA aus der identifizierten Nucleotidsequenz, die Aminosäuresequenz abzuleiten (Abb. 7).

Man fand dabei vier verschiedene Phytochromgene, von denen

bisher zwei Gene vollständig und ein Gen mit der Basensequenz für die aminoterminalen Hälfte des Proteins in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten.

Sie ergaben zwei komplette Proteinketten von jeweils 1129 Aminosäuren und eine partielle Proteinkette mit 495 Aminosäuren mit einer Homologie von 98%. Die Substitution der ausgetauschten Aminosäuren ist zumeist konservativ (Abb. 7). Die Primärstruktur von Phytochrom sollte aber auch auf konventionellem proteinchemischem Weg durch Sequenzierung proteolytischer Fragmente zumindest teilweise bestimmt werden und daraus die Richtigkeit der aus der Nucleotidsequenz abgeleiteten Proteinsequenz abgeklärt werden.

2.1. Totalfragmentierung mit Trypsin

Dazu wurde Phytochrom mit einem SAR = 0.99 tryptisch durchgespalten und das Peptidgemisch über Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt.

Da zu dem damaligen Zeitpunkt (Dez. 1985) bekannt war, daß von Hershey et al. die Nucleotidsequenz aufgeklärt und zur Publikation eingereicht war, wurden nur 2 Peptidfraktionen nochmals über einen weiteren Umkehrphasen-HPLC-Lauf aufgereinigt und im Gasphasensequenzator durchsequenziert.

Die determinierten Sequenzen lauten :

E	V	F	D	L	T	G	Y	D	R
228									237

F	S	P	V	G	G	S	V	E	I	S	S	K
1028												1040

Die Sequenzen beider Peptide konnten in der Gesamtsequenz

1 M S S S R P A S S S S S R N R Q S S Q A R V L A Q T T L D A
 31 E L N A E Y E E S G D S F D Y S K L V E A Q R D G P P V Q Q
 61 G R S E K V I A Y L Q H I Q K G K L I Q T F G C L ⁺ L L A L D E
 91 K S F N V I A F S E N A P E M L T T V S H A V P S V D D P P
 121 R L G I G T N V R S L F S D Q G A T A L H K A L G F A D V S
 151 L L N P I L V Q C K T S G K P F Y A I V H R A T G C L V V D
 181 F E P V K P T E F P A T A A G A L Q S Y K L A A K A I S K I
 211 Q S L P G G S M E V L ⁺⁺ C N T V V K E V F D L T G Y D R V M A
 241 Y K F H E D D H G E V F S ⁺ E I T K P G L E P Y L G L H Y P A
 271 T D I P Q A A R ⁺⁺ L L F M K N K V R M I C D C R A R S I K V I
 301 E A E A L P F D I S L C G S A L R A P H S C H L Q Y M E N M
 331 N S I A S L V M A V V V N E N E E D D E A E S E Q P A Q Q Q
 361 ⁺ K K K K L W G L L V C H H E S P R Y V P F P L R Y A C E F L
 391 A Q V F A V H V M R E F E L E K Q L R E K ⁺ N I L K M Q T M L
 421 S D M L F R E A S P L T I V S G ⁺⁺ T P N I M D L V K C D G A A
 451 L L Y G G K V W R L R N A P T E S Q I H D I A F W L S D V H
 481 R D S T G L S T D S L H D A G Y P G A A A L G D M I C G M A
 511 V A K I N S K D I ⁺ L F W F R S H T A A E I R W G G A K N D P ⁺
 541 S D M D D S R R M H P R L S F K A E L F V V K M K S L P W S ⁺
 571 D Y E M D A I H S L Q L I L R G T L N D A S K P K R E A S L
 601 D N Q I G D L K L D G L A F L Q A V T S E M V R L M E T A T
 631 V P I L A V D G N G L V N G W N Q K A A E L T G L R V D D A
 661 I G R H I L T L V E D ⁺ S S V P V V Q R M L Y I A L Q G K E E
 691 K E V R F E V K T H G P K ⁺ R D D G P V I L V V N A C A S R D
 721 L H D H V V G V C F V A Q D M T V H K L V M D K F T R V E G
 751 D Y K A I I H N P N P L I P P I F G A D E F G W C S E W N A

```

781  A M T K L T G W N R D E V L D K M L L G E V F D S S N A S C
811  P L K N R ++ D A F V S L C V L I N S A L A G E E T E K A P F G
841  F F D R S G K Y I E C L L S A N R K E N E G G L I T G V F C
871  F I H V A S H E L Q H A L Q V Q Q A S E Q T S L K R L K A F
901  S Y M R H A I N N P L S G M L Y S R K A L K N T D L N E E Q
931  M K Q I H V G D N C H H Q I N K I L A D L D Q D S I + T E K S
961  S C L D L E M A E F ++ L L Q D V V V A A V S Q V L I T C Q G K
991  G I R I S C N L P E R F M K Q S V Y G D G V R L Q Q I L S D
1021 F L F I S V K F S P V G G S V E I S S K L T K N S I G E N L
1051 H L I D L E L R I K H Q G L G V P A E L M A + Q M F E E D N K
1081 E Q + S E + E G L S L L V S R N L L R L M N G D V R H L R E A G
1111 V S T F I + I T A E L A S A P T A M G + Q

```

Abb. 7: Aminosäuresequenz von 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer, abgeleitet aus der Basensequenz des AP 3-Gens (Hershey et al., 1985).

Eingerahmt wurden sämtliche per Sequenator bestimmten Sequenzen der unter III.1. bis 5. beschriebenen proteolytischen Fragmente von 124 kDa-Phytochrom

+ Aminosäureaustauschpositionen in der Sequenz aus dem AP 4-Gen:

Q 19 = R, L 85 = M, S 253 = A, L 279 = F, K 361 = Q,
 N 412 = S, T 437 = A, L 520 = I, N 538 = H, P 540 = S,
 S 570 = T, D 671 = E, K 703 = R, R 815 = K, D 816 = N,
 T 957 = S, L 971 = V, L 972 = F, A 1072 = E, E 1084 = D,
 S 1088 = E, N 1094 = K, I 1116 = L, M 1127 = I

++ Aminosäureaustauschpositionen in der Sequenz aus dem AP 5-Gen:

V 220 = M, L 279 = F, T 437 = N

lokalisiert werden. Mit der Sequenz des tryptischen Undeca-peptids, das von E-228 bis R-237 reicht, und der Sequenz des tryptischen Tridecapeptids, das von F-1028 bis K-1040 reicht, wurden gleichermaßen Teilsequenzen aus dem N- und C-terminalen Bereich des Proteins erfaßt (Abb. 7).

2.2. Bestimmung des Aminoterminus

100 pmol Phytochrom mit einem SAR = 0.99 wurden nach der Dialyse gegen bidest. H₂O direkt in den Gasphasensequenator appliziert. Da bei dem vollautomatischen Edman-Abbau keine PTH-Aminosäure detektiert werden konnte, muß der Aminoterminus blockiert sein. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von P. Quail (1983) überein.

Spekulativ läßt sich ein Formyl-Methionin am Aminoterminus der Proteinkette vermuten.

Falls aber Formyl-Methionin post-translational abgespalten wird, müßte der darauffolgende Serinrest den blockierten Aminoterminus bilden. Hershey et al. (1985) formulierten zwar aufgrund der DNA-Sequenzierung Methionin als aminoterminale Aminosäure und zählen in der Abbildung 4 ihrer Veröffentlichung Methionin als erste Aminosäure vom Aminoterminus. Sie beginnen aber im Text mit der fortlaufenden Nummerierung der Aminosäuresequenz erst mit dem nach Methionin folgenden Serinrest.

Da es aber keinen definitiven Beweis gibt, welche Aminosäure tatsächlich den Aminoterminus darstellt, beginnen wir die fortlaufende Nummerierung der Aminosäurenkette im Gegensatz zur Gruppe von P. Quail nicht mit S-1, sondern mit M-1.

2.3. Heterogenität von Phytochrom

Eine Heterogenität von Phytochrom wird seit einiger Zeit aufgrund verschiedenster Beobachtungen, die von Lagarias (1985) zusammengefaßt wurden, diskutiert. So wurden u.a. nach in vivo spektrophotometrischen Messungen durch unterschiedliche Phototransformationskinetiken, nichtphotochemische P_{fr} - P_r Konversion und Dunkeldestruktion von P_{fr} verschiedene Phytochromspezies gefordert (Takimoto und Saji, 1984). Auch bei der Auftrennung reiner Phytochrompräparationen durch IEF konnten mehrere Banden identifiziert werden, die bei zweidimensionaler Auftrennung im SDS-Gel Proteinbanden mit einem M_r von jeweils 124 kDa ergaben (R. Schendel, Dissertationsarbeit).

Bei der Aufklärung der Primärstruktur von Phytochrom aus etioliertem Hafer über die Identifizierung und Sequenzierung von c-DNA und genomischer DNA fanden Hershey et al. (1985) schließlich auch wenigstens vier verschiedene Phytochromgene, von denen zwei Gene vollständig und ein Gen partiell in ihrer Struktur aufgeklärt werden konnten. Die sequenzierten Gene wurden mit AP 3, AP 4 und AP 5 bezeichnet. Mindestens 80% aller identifizierten Phytochromklone sind AP 4 und AP 5 zuzuordnen.

Vollkommen unklar jedoch war bisher, wieviele und welche der identifizierten Phytochromgene in etioliertem Hafer tatsächlich als Proteine exprimiert werden.

Bei der Sequenzierung eines 16 kDa-Subtilisinfragments, das nach 24 h Inkubation von nativem Phytochrom mit 1% (w/w) Subtilisin bei RT erhalten wurde, konnte eine heterogene Sequenz identifiziert werden:

S L P G G S M E L
 V
 M
 212 221

Die Schritte 6 - 10 des vollautomatischen Edmanabbaus im Sequenator sind in Bezug auf die Ausbeute von Methionin und Valin in Abb. 8 graphisch dargestellt.

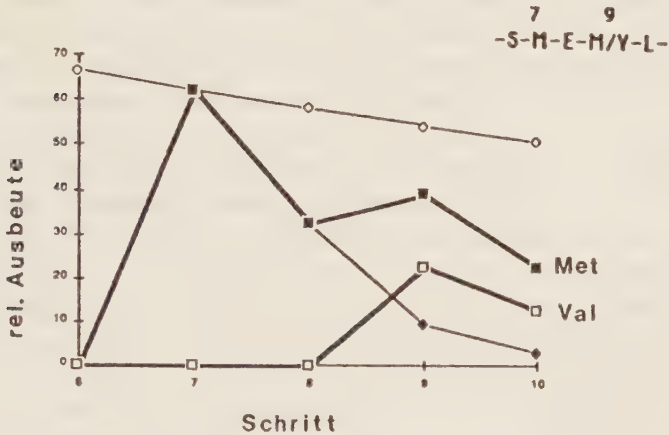


Abb. 8: Graphische Darstellung der heterogenen aminoterminalen Sequenz des 16 kDa-Subtilisinfragments von Schritt 6 bis Schritt 10 des vollautomatischen Edmanabbaus im Sequenator in Bezug auf das Erscheinen von Methionin und Valin

- — ○ = zu erwartende Gesamtmenge an PTH-Aminosäuren
- — ■ = Ausbeute an PTH-Met
- — □ = Ausbeute an PTH-Val
- ◆ — ◆ = theoretische Überlappungsmenge an PTH-Met

Deutlich sichtbar erreicht M, das im Schritt 6 nicht detektierbar war, im Schritt 7 die Gerade, die bei einer repetitiven Ausbeute von 93.5% von einem Edmanabbauschritt zum nächsten die zu erwartende Gesamtmenge an Aminosäuren repräsentiert. In der theoretischen Überlappungs-Kurve für M nimmt im Schritt 8 M gemäß dem Erscheinen von E (nicht eingezeichnet) ab. Im 9. Schritt entspricht die Abnahme von M

aber nicht mehr der theoretischen Überlappungs-Kurve. Man erhält einen signifikanten Anstieg von M als Hinweis auf einen zusätzlich auftretenden M-Rest. Gleichzeitig erreicht V, das im 8. Schritt noch nicht detektierbar war, im Schritt 9 nicht die zu erwartende Gesamtmengenkurve. Dies ist ein weiterer Beweis, daß bei diesem Edmanabbauschritt zumindest zwei Aminosäuren vorliegen. Bei der graphischen Berechnung der absoluten Menge von M ($M_{\text{gesamt}} - M_{\text{Methionin}}$) und von V im Schritt 9 erhält man ein quantitatives Verhältnis von $M = 1.3$ zu $V = 1$. Da bei der Detektion der PTH-Aminosäuren V im Vergleich zu M einen höheren Hintergrund besitzt, ist der Gehalt an V im Schritt 9 etwas zu niedrig bewertet. Relativiert man dementsprechend das Verhältnis von M zu V, so sind auch Verhältnisse von M : V wie 1 : 1 möglich. Die Gesamtmenge beider Aminosäuren entspricht der zu erwartenden Gesamtmenge. Schritt 10 zeigt die durch das Erscheinen von L bedingte Abnahme von V und M.

An Position 220 der Polypeptidkette konnte also sowohl Valin als auch Methionin nachgewiesen werden.

Dies bedeutet, daß die Peptidkette des AP 5-Gens mit dem Methioninrest und die Peptidkette des AP 3- und, oder des AP 4-Gens mit dem Valinrest in etioliertem Hafer tatsächlich exprimiert werden.

Unter der Voraussetzung, daß in den gereinigten Phytochromproben die verschiedenen Genprodukte annähernd quantitativ erfaßt werden, ist das Verhältnis der Genprodukte AP 5 zu AP 3 + AP 4 wie 1 : 1. Bezieht man dieses Verhältnis auf das Mengenverhältnis der gefundenen Klone ($AP 4 + AP 5 = 80\%$, $AP 3 < 20\%$), so können für die drei Gene folgende relative Verhältnisse gefolgert werden:

$AP 3 = 20\%$, $AP 4 = 30\%$ und $AP 5 = 50\%$.

Hiermit gelang der erste Beweis, daß Phytochrom - zumindest in etioliertem Hafer - als Isoprotein vorhanden ist.

2.4. Bestimmung post-translationaler Modifikationen

Da häufig nach der Synthese eines Polypeptids an den Ribosomen noch kovalente Modifikationen (= Processing) vorgenommen werden, um es in seine biologisch aktive Form zu überführen, erschien es interessant natives Phytochrom auf einen möglichen Gehalt an Phosphatresten, Phosphodiesterbrücken und Aminosuktern durchzuführen.

2.4.1. Bestimmung von Phosphatresten

Dazu wurde natives Phytochrom in der P_r - und P_{fr} -Form mit dem Enzym alkalische Phosphatase für unterschiedliche Zeiten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Inkubationsansätze mit IEF. Im Vergleich zu unbehandelten Phytochromproben ergaben sich im Bandenmuster keine Veränderungen, sodaß auf der Proteinoberfläche des isolierten 124 kDa-Phytochroms wahrscheinlich keine Phosphatreste lokalisiert sind.

2.4.2. Bestimmung von Phosphodiesterbrücken

Für diese Untersuchungen wurde natives Phytochrom mit dem Enzym Phosphodiesterase inkubiert und Aliquots aus den Inkubationsansätzen nach verschiedenen Zeiten entnommen und über IEF aufgetrennt.

Das gleichbleibende Bandenmuster wies auch auf eine Abwesenheit von Phosphodiesterbrücken hin.

2.4.3. Bestimmung von Aminosuktern

Da in der Proteinsequenz von Phytochrom eine mögliche, charakteristische Bindungsstelle von Aminosuktern im C-terminalen Bereich (N-807 - X - S-809) vorhanden ist, wurde auch

diese Möglichkeit einer Modifikation überprüft. Zur Bestimmung der Aminosucker Glucosamin, Galactosamin und Mannosamin wurde natives Phytochrom einer Kurzzeithydrolyse von 24 h und einer Langzeithydrolyse von 96 h mit 6 N HCl bei 110°C unterzogen. Bei dieser langen Hydrolysezeit werden die Aminosucker zerstört, sodaß ihre charakteristischen Peaks im Elutionsdiagramm der Hydrolyseprodukte nach Auftrennung über Ionenaustauschssäule und nach Detektion mit Ninhydrin verschwinden. In dem Elutionsdiagramm der hydrolysierten Phytochromprobe (Abb. 9 b) sind im Bereich der Aminosucker vier Peaks (Nr. 3, 4, 5 und 6) zu sehen. Im Vergleich zu den R_f -Werten einer Standardlösung von Aminosäuren mit Zusatz von Glucosamin und Galactosamin - Mannosamin besitzt den gleichen R_f -Wert wie Galactosamin - (Abb. 9 a, Nr. 1 und 2), besitzen die verschiedenen Peaks der Hydrolyseprodukte von Phytochrom im Bereich der Aminosucker abweichende R_f -Werte von Glucosamin und Galactosamin bzw. Mannosamin (Abb. 9 b).

Im Elutionsdiagramm der hydrolysierten Phytochromprobe, der Glucosamin und Galactosamin zugesetzt wurde (Abb. 9 c), sind neben den vier Peaks aus Abb. 9 b, die zwei zusätzlichen Peaks von Glucosamin und Galactosamin zu sehen (Abb. 9 c, Nr. 1, 2, 3, 4, 5 und 6).

Da sich auch die Elutionsdiagramme der Kurzzeit- und Langzeithydrolyse von Phytochrom im Bereich der Aminosucker nicht unterscheiden, kann festgestellt werden, daß wahrscheinlich an Phytochrom weder die Aminosucker Glucosamin und Galactosamin noch Mannosamin gebunden sind.

Bei den nach der Auftrennung über Ionenaustauschssäule und Ninhydrin-Detektion im Bereich der Aminosucker auftretenden Produkten, die bei der Totalhydrolyse von Phytochrom mit 6 N HCl für 24 h bei 110°C entstehen, könnte es sich um verschiedene Hydrolyseprodukte des Tetrapyrrol-Chromophors handeln oder um Reaktionsprodukte der Aminosäuren mit diesen Tetrapyrrolhydrolyseprodukten.

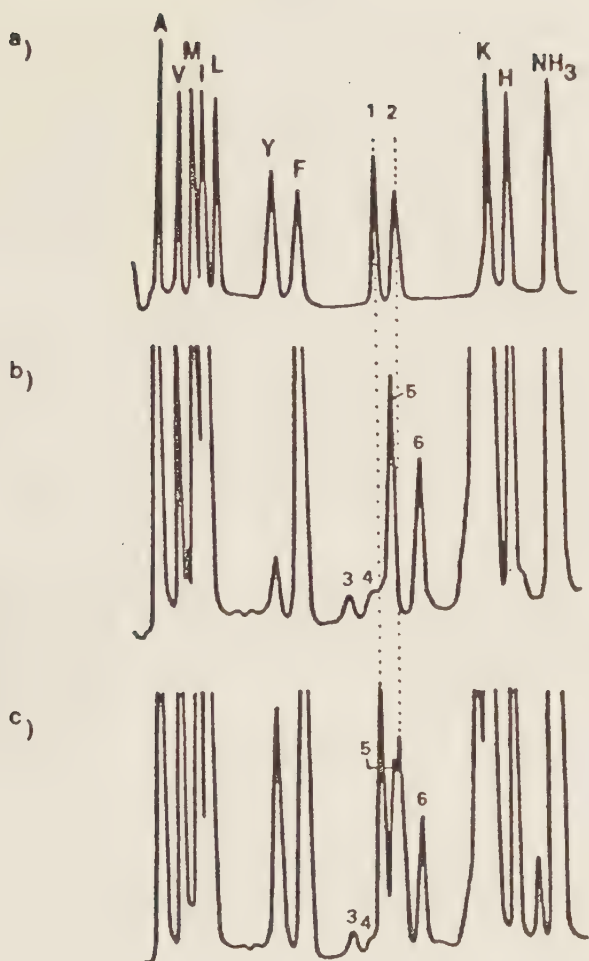


Abb. 9: Bestimmung von Aminosuktern über Ionenaustauschsäule und Ninhydrin-Detektion

- a: Standardgemisch aller Aminosäuren mit Glucosamin (=1) und Galactosamin / Mannosamin (=2)
- b: Totalhydrolyse von 124 kDa-Phytochrom mit 6 N HCl bei 110°C für 24 h und 96 h
- c: Totalhydrolyse von 124 kDa-Phytochrom mit 6 N HCl bei 110°C für 24 h mit Zusatz von je 5 nmol Glucosamin und Galactosamin

3. Fragmentierung von Phytochrom mit Proteasen

Hinweise auf die dreidimensionale Struktur, sowie auf separate Domänen in der Struktur von Phytochrom hinsichtlich spektraler Eigenschaften oder antigener Determinanten erhält man, wenn man das native Protein einer schrittweisen partiellen Proteolyse unter kontrollierten Bedingungen unterzieht und die entstehenden Fragmente der Gesamtsequenz zuordnet.

Durch Partialproteolyse beider Phytochromformen P_r und P_{fr} im nativen Zustand, Sequenzierung und Zuordnung der Fragmente in die Gesamtsequenz, die entweder nur in der P_r -Form oder nur in der P_{fr} -Form auftreten, sollte es auch möglich sein, die Teile im nativen Protein zu charakterisieren, die bei der Photokonversion von P_r zu P_{fr} , und umgekehrt, die Konformationsänderungen im Protein durchführen.

Für diese Untersuchungszwecke wurde natives Phytochrom mit endogenen Proteasen aus Haferrohextrakt und den spezifischen Endopeptidasen Trypsin, Endoproteinase Lys-C, Endoproteinase Glu-C und Subtilisin partiell proteolytisch gespalten.

3.1. Proteolyse mit endogenen Proteasen

In Übereinstimmung mit den Proteolyseversuchen von Daniels und Quail (1984) wurde gereinigtes Phytochrom in der P_r -Form mit 10 Volumenprozenten eines partiell gereinigten Rohextraktes aus etiolierten Haferkeimlingen bei 20°C inkubiert. Im Gegensatz zu deren Versuchen und zu Arbeiten anderer Gruppen (Jones et al., 1985, Cordonnier et al., 1985) wurde jedoch mit wesentlich höheren Phytochromkonzentrationen gearbeitet. So wurden z.B. 10-fach höhere Phytochrommengen eingesetzt als bei Daniels und Quail (1984).

Nach definierten Zeiten wurden unter Berücksichtigung der spektralen Veränderungen im Absorptionsspektrum der inkubierten Proben Aliquots entnommen und gelelektrophoretisch

aufgetrennt. Die Proteolyse, die im Vergleich zu den Literaturwerten langsamer verlief, erbrachte sukzessiv drei Peptide mit einem M_r von 118, 116 und 114 kDa nach Auftrennung und M_r -Bestimmung im Polyacrylamidgel (Abb. 10).

Nach 31 h erschien neben dem unverdauten 124 kDa-Phytochrom ein 118 kDa-Fragment (Abb. 10). Nach insgesamt 99 h Inkubation war auch das 118 kDa-Fragment vollständig weiterverdaut und es tauchte im Polyacrylamidgel eine Doppelbande bei 116/114 kDa auf (Abb. 10).

Im Absorptionsspektrum des Inkubationsansatzes nach 31 h war in der P_{rr} -Form bereits ein Shift im Absorptionsmaximum von 730 nm nach 728 - 726 nm zu erkennen, während das Maximum nach 99 h bei 722 - 724 nm lag. Dieses Absorptionsmaximum entspricht dem Wert für das sog. "Große Phytochrom" (Quail et al., 1983).

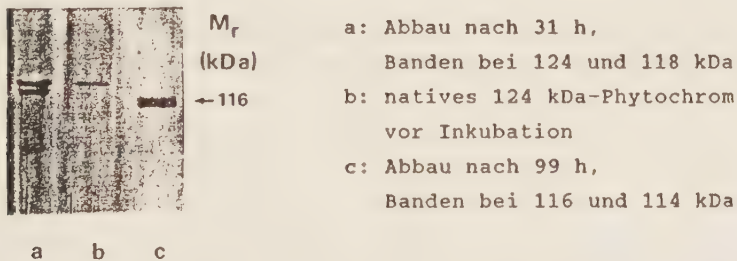


Abb. 10: Auftrennung der proteolytischen Fragmente aus dem Abbau mit endogenen Proteasen im 7.5% - Gel

Nach Auftrennung der Inkubationsansätze über PAGE und Elektrophoretoblot auf aktivierte Gf wurden die jeweiligen Aminotermini der Peptide aus den beiden Doppelbanden bei 124/118 kDa und 116 / 114 kDa per Sequenator bestimmt. Überraschenderweise wurde die einheitliche aminoterminal Sequenz gefunden:

A E Y E E S
34 39

Da die Ausbeute an PTH-Aminosäuren der 124/118 kDa-Peptide im Vergleich zu der im Sequenator applizierten Proteinmenge zu gering war und für das native 124 kDa-Phytochrom ein blockierter Aminoterminus bestimmt war (III.2.2.), ist diese aminoterminal Sequenz dem 118 kDa-Fragment zuzuordnen. Im Gegensatz zu den geringen Ausbeuten der 124/118 kDa-Peptide entsprach bei der 116/114 kDa-Doppelbande die Ausbeute an PTH-Aminosäuren der applizierten Menge der Peptide, sodaß beiden Fragmenten die aminoterminal Sequenz zugeordnet werden kann.

Der primäre Hauptangriff der endogenen Proteasen ist demnach die Peptidbindung zwischen N-33 und A-34, sodaß alle Fragmente mit Aminosäure 34 der Gesamtsequenz des nativen Phytochroms beginnen. Die Unterschiede in der Größe der Fragmente müssen demnach im C-terminalen Bereich zu suchen sein. Entsprechend dem M_r der Fragmente von 114, 116 und 118 kDa sind die Carboxyltermini etwa bei den Aminosäuren 1070, 1090 bzw. 1110 der Gesamtsequenz lokalisiert.

3.2. Proteolyse mit Trypsin

Trypsin eignet sich gut für Strukturuntersuchungen von Proteinen aufgrund seines spezifischen Spaltungsvermögens hinter den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Im Gegensatz zu den unspezifischen Spaltungsreaktionen des im Rohextrakt vorliegenden Gemisches unbekannter endogener Proteasen ist die Zuordnung der C-terminalen Aminosäure von tryptischen Peptiden in der Gesamtsequenz des nativen Proteins vereinfacht und zuverlässiger.

In Anlehnung an die Proteolyseversuche mit Trypsin durch Lagarias und Mercurio (1985) und durch Jones und Quail (1986) wurde Phytochrom in der P_r -Form und in der P_{fr} -Form unter Verfolgung der Veränderung spektraler Eigenschaften verschiedenen Abbaukinetiken unterzogen.

3.2.1. Inkubation mit 1% (w/w) Trypsin bei Raumtemperatur

Phytochrom mit einem $SAR = 0.90 - 0.99$ wurde in der P_r - und P_{fr} -Form bei Raumtemperatur mit 1% (w/w) Trypsin inkubiert. Nach definierten Zeiten wurden Aliquots entnommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter diesen Abbaubedingungen erhält man gleiche Peptidmuster für beide Phytochromformen, wenngleich die Proteolyse der P_{fr} -Form langsamer verläuft (Abb. 1).

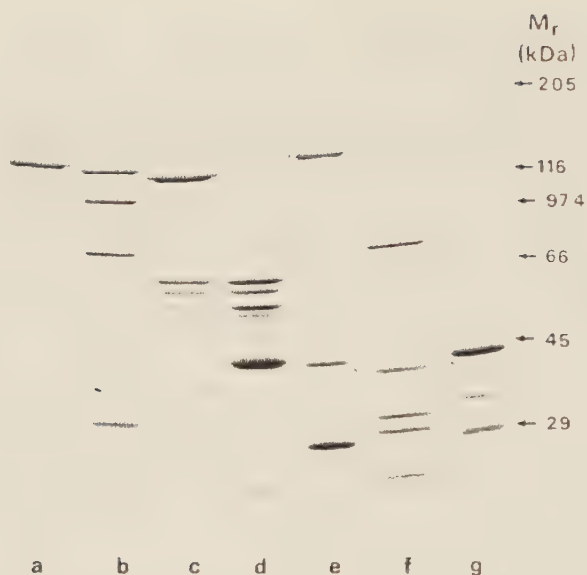


Abb. 11: Abbau von nativem Phytochrom mit 1% (w/w) Trypsin bei RT. Auftrennung der Peptide im 7.5 - 15% - Gradientengel

a: 124 kDa-Phytochrom

b: Markerproteine: 205, 116, 97.4, 66, 45 und 29 kDa

c: Abbau der P_r -Form nach 1 min.

d: Abbau der P_r -Form nach 20 h bei 4°C mit 0.1% (w/w) Trypsin

e: Abbau der P_r -Form nach 3.5 h + 124 kDa-Phytochrom

f: Markerproteine: 66, 45, 36, 29, 24 und 20 kDa

g: Abbau der P_r -Form nach 1 h

Als stabile Peptide beider Phytochromformen kristallisierten sich Fragmente mit folgenden Molekulargewichten heraus (Abb. 11):

113, 59, 55, 52, 39, 31, 23.5, 13 und 8.8 kDa.

10 - 50 pmol dieser Fragmente wurden nach Auftrennung über PAGE und Elektrobplot auf aktivierte Gf der Mikrosequenzierung im Gasphasensequenator unterzogen. Die mit Hilfe des Sequenators bestimmten aminoterminalen Sequenzen dieser Peptide, die zumeist aus zwei verschiedenen Präparationen bestimmt wurden, sind u.a. in Tab. 4 zusammengefaßt.

3.2.2. Inkubation mit 0.1% (w/w) Trypsin bei 4°C

Nach Rice und Briggs (1973) sollte das als "Kleines Phytochrom" bezeichnete Degradierungsprodukt mit 60 kDa auch durch tryptische Spaltung des nativen Moleküls zugänglich sein. Dies gelang entsprechend den beschriebenen Abbaubedingungen mit 0.1% (w/w) Trypsin bei 4°C (Abb. 11, Spur d). Auch die aminoterminal Sequenz dieses Peptids wurde bestimmt. Sie beginnt ebenfalls mit V-66.

Tab. 4: Fragmente aus der Partialproteolyse vom 124-kDa-Haferphytochrom mit Trypsin. Die Auftrennung der proteolytischen Fragmente erfolgte über PAGE. Anschließend wurden die Peptide auf aktivierte Gf geblottet und ansequenziert.

M _r [kDa] aus Gel	Sequenz	Aminoterminale Aminosäure	Carboxyterminale Aminosäure +	Berechnetes M _r ++ [kDa]
122	VLA	V- 22	Q-1129	122.6
113a +++	DGPP	D- 54	R-1093/R-1097	114.3/114.7
113b +++	SEKV	S- 63	R-1093/R-1097	113.3/113.7
113c +++	VIAY	V- 66	R-1093/R-1097	113.0/113.4
83	blocked	M- 1	K- 753	82.8
59a +++	SEKVIA	S- 63	K- 595/R- 596	58.5
59b +++	VIAYLQ	V- 66	K- 595/R- 596	58.2
55a +++	VIAY	V- 66	K- 563/K- 565	54.7/ 54.9
55b +++	REASL	R-596	R-1093/R-1097	54.7
55c +++	EASLD	E-597	R-1093/R-1097	54.6
52a +++	SEKVI	S- 63	R- 532/K- 537	51.6/ 52.1
52b +++	VIAYL	V- 66	R- 532/K- 537	51.3/ 51.8
52c +++	LMETA	L-625	R-1093	51.6
39	VIAY	V- 66	R- 426	39.6
31	ALG	A-143	R- 426	31.1
23.5a+++	VIA	V- 66	R- 278/K- 283	23.3/ 23.9
23.5b+++	IQS	I-210	R- 426	23.7
13	VIAY	V- 66	K- 185	13.2
9	LMET	L-625	K- 703/R- 704	8.7/ 8.8

+ Wahrscheinlichste tryptische Schnittstelle gemäß M_r-Bestimmung über PAGE.

++ Berechnet aus der Distanz von aminoterminaler zu carboxyterminaler Aminosäure.

+++ SDS-PAGE-Banden erwiesen sich beim Sequenzieren als heterogen.

3.2.3. Unterschiede im tryptischen Abbaumuster von P_r und P_{tr}

Während im Abbaumuster von P_r und P_{tr} nach Inkubation mit 1% (w/w) Trypsin bei RT keine Unterschiede zu sehen sind, lassen sich nach Inkubation mit 0.2% (w/w) Trypsin bei 4°C, gemäß Lagarias und Mercurio (1985), Unterschiede im Peptidmuster beider Phytochromformen darstellen (Abb. 12).

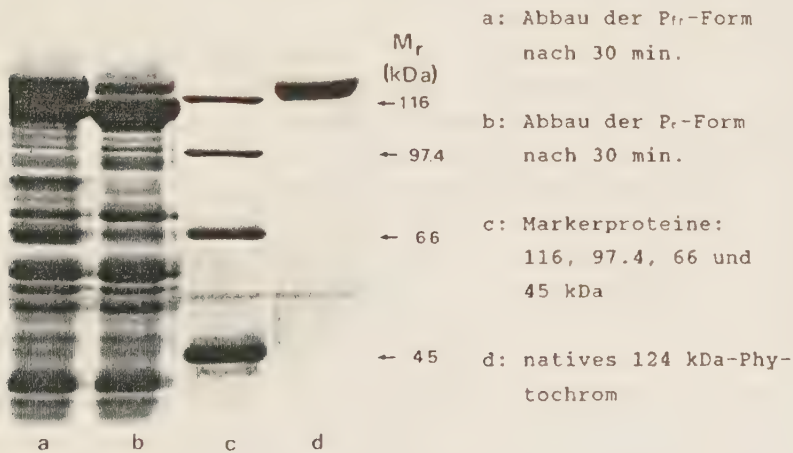


Abb. 12: Abbau von Phytochrom mit 0.2% (w/w) Trypsin bei 4°C
Auftrennung der Peptide im 10% - Gel

Die Abbaumuster beider Phytochromformen mit Trypsin entsprechen den Ergebnissen von Lagarias und Mercurio (1985). Deutlich sichtbar erscheint im Abbaumuster der P_{tr} -Form (Abb. 12, Spur a) nach 30 min. Inkubation ein Peptid mit einem M_r von ca. 83 kDa, das im Abbaumuster der P_r -Form (Abb. 12, Spur b) fehlt.

Nach Auftrennung der größten Peptide in einem 5% - Gel ist nur beim Abbau der P_r -Form eine Doppelbande bei 124/122 kDa zu sehen.

3.2.4. Lokalisierung der tryptischen Peptide in der Gesamtsequenz

Sämtliche in 3.2.1. - 3.2.3. beschriebenen Peptide wurden 3 - 6 Edmanabbauschritten im Sequenator unterworfen. Diese Sequenzlänge ist für die Lokalisierung der Aminotermini der jeweiligen Peptide in der Gesamtsequenz ausreichend. Alle aminoterminalen Sequenzen der tryptischen Fragmente konnten ohne Ausnahme in die Gesamtsequenz von Phytochrom eingeordnet werden (Abb. 7, umrandet).

Die Position der C-terminalen Aminosäure der einzelnen Fragmente ergibt sich einerseits aus der Bestimmung des M_r aus dem Polyacrylamidgel, andererseits muß sich aufgrund der spezifischen Spaltung von Trypsin hinter Lysin oder Arginin ein basischer Rest am Carboxylterminus befinden. So läßt sich mit annähernder Genauigkeit die C-terminale Aminosäure eines Fragments bestimmen.

Aus der Zuordnung der aminoterminalen Sequenzen in die Gesamtsequenz und dem apparenten M_r der jeweiligen Fragmente läßt sich das in Abb. 13 dargestellte Lokalisationsschema der tryptischen Fragmente aufzeichnen.

Der primäre proteolytische Angriff durch Trypsin findet in der P_r-Form am Aminoterminus statt. Durch die Spaltung nach R-21 werden ein oder mehrere Peptide von insgesamt 2.3 kDa vom Aminoterminus des nativen Phytochroms abgespalten, wobei ein Chromopeptid mit 122.6 kDa entsteht. Dieses Fragment sollte aufgrund des über PAGE bestimmten M_r von 122 kDa den intakten Carboxylterminus noch besitzen, da bei einer gleichzeitigen Spaltung am C-Terminus hinter der letzten basischen Aminosäure R-1107 ein Peptid von lediglich 120 kDa entstehen würde. Die gelelektrophoretische Auftrennung dieses Fragments vom 124 kDa-Peptid müßte aber deutlicher zu erkennen sein. Als ein auffälliges Charakteristikum des 2.3 kDa-Restes sei erwähnt, daß allein 10 Reste die Aminosäure Serin darstellen.

Dieser tryptische Primärangriff an der Proteinkette konnte

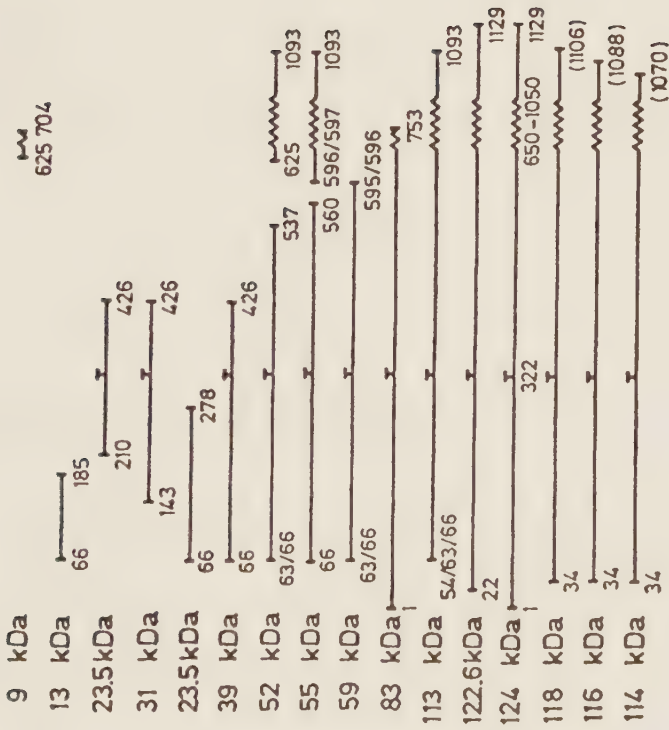


Abb. 13: Lokalisationsschema der Fragmente aus dem Abbau mit Trypsin (oberer Teil) und mit endogenen Proteasen (unterer Teil). r = Tetrahyrrol-Chromophor

in der P_{II} -Form nicht nachgewiesen werden.

Das nächste sich stabilisierende Fragment in beiden Phytochromformen ist ein Fragment mit ca. 113 kDa, das von S-63, V-66 bis R-1093 oder R-1097 reicht. Die weiteren basischen Reste R-1104 und R-1107 sind aufgrund der daraus resultierenden M_r der Fragmente von 114.4 und 114.7 kDa als mögliche C-terminale Aminosäuren ebenfalls in Betracht zu ziehen. Zusätzlich wurde ausschließlich in der P_I -Form eine Sequenz in der 113 kDa-Bande detektiert, die mit D-54 beginnt.

Dies bedeutet, daß nun von beiden Proteinen kleine Peptide abgespalten wurden.

Ausschließlich in der P_{II} -Form entsteht ein 83 kDa-Peptid, dessen Aminoterminus blockiert ist. Dieses P_{II} -spezifische 83 kDa-Fragment besitzt also noch den intakten Aminoterminus und beginnt gemäß unserer Sequenznummerierung mit M-1. Entsprechend des über PAGE bestimmten M_r müßte K-753 die C-terminale Aminosäure bilden. Die nächstgelegenen basischen Reste K-744 (= 81.8 kDa) und K-784 (= 82.4 kDa) erscheinen als C-Terminus ebenfalls möglich, während K-784 aufgrund des berechneten Molekulargewichts von 86.2 kDa als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Das 113 kDa-Fragment wird nun in ein 59 kDa-Chromopeptid weitergespalten, das unter verschiedensten Abbaubedingungen gebildet wird.

Das 59 kDa-Fragment entspricht mit seinen spektralen Eigenschaften dem von Rice und Briggs (1973) beschriebenen "Kleinen Phytochrom". Dieses Peptid erstreckt sich von S-63, V-66 mit hoher Wahrscheinlichkeit bis zu den beiden basischen Resten K-595, R-596, hinter denen ein 55 kDa-Peptid aus dem C-terminalen Bereich des Proteins herausgespalten wird. Die Sequenz des 55 kDa-Fragments erstreckt sich von R-596, E-597 bis zu R-1093 oder R-1097.

Aus diesem Fragment geht nun durch aminoterminalen Abspaltung von 28 bzw. 29 Aminosäuren ein 52 kDa-Fragment hervor, das mit L-625 beginnt und dessen Carboxyterminus ebenfalls

R-1093 oder R-1097 bildet.

Das 52 kDa-Fragment wird nun sehr rasch in kleinste Peptide weitergespalten und nur ein Peptid mit 8.8 kDa bleibt über längere Zeit stabil. Es reicht von L-625 bis K-703 oder R-704.

Das 59 kDa-Chromopeptid, dessen Aminoterminus S-63, V-66 bilden, wird seinerseits tryptisch C-terminal weitergespalten. Zunächst entsteht daraus ein 55 kDa-Fragment, dessen Sequenz von V-66 bis K-563 oder K-565 reicht. K-556 muß aufgrund des berechneten M_r von 53.9 kDa ebenfalls als mögliche C-terminale Aminosäure angesehen werden. Aus diesem 55 kDa-Fragment entsteht ein 52 kDa-Fragment, dessen Sequenz von V-66 bis R-532 oder K-537 läuft. R-524 als C-terminale Aminosäure erscheint weniger wahrscheinlich, da sich daraus ein berechnetes M_r von 50.4 kDa ergibt.

Dieses 52 kDa-Chromopeptid aus der aminoterminalen Hälfte des nativen Proteins wird nun weiter C-terminal zu einem 39 kDa-Chromopeptid gespalten, dessen Sequenz von V-66 bis R-426 reicht. R-426 kann mit größter Wahrscheinlichkeit als C-terminale Aminosäure angesehen werden, da sie ebenfalls als wahrscheinlichster C-Terminus weiterer Fragmente mit 31 kDa und 23.5 kDa in Betracht kommt und die nächstliegenden basischen Reste K-415 bzw. K-445 mit den berechneten M_r von 38.4 kDa bzw. 41.8 kDa relativ stark von dem über PAGE bestimmten M_r von 39.6 kDa abweichen.

Dieses 39 kDa-Fragment verfügt nur noch über eine eingeschränkte Protein-Chromophor-Interaktion (Reiff et al., 1985). Es weist neben der P_r -Form anstelle der P_{rr} -Form eine gebleichte Form mit einem Absorptionsmaximum bei 654 nm auf, die durch saturierende DR-Belichtung wieder vollständig in die P_r -Form revertierbar ist.

Die weitere Proteolyse des 39 kDa-Fragments verläuft nun heterogen. Man erhält zwei Peptide mit 23.5 und 13 kDa, die keinen Chromophor tragen. Das 23.5 kDa-Fragment erstreckt sich von V-66 bis R-278 oder K-283. Die nächsten basischen Reste K-285 und R-287 erscheinen als C-terminale Aminosäure

unwahrscheinlich. Die daraus berechneten M_r der Fragmente betragen 24.1 kDa und 24.3 kDa. Da das tryptische 23.5 kDa-Fragment sich nach der elektrophoretischen Auftrennung aber etwas unterhalb der Position des 24.0 kDa-Markerproteins befindet, können K-285 und R-287 als C-Terminus als unwahrscheinlich angesehen werden.

V-66 bildet ebenfalls den Aminoterminus des 13 kDa-Fragments, dessen Carboxyterminus mit K-185 lokalisiert werden kann. Neben diesen beiden chromophorfreen Peptiden erhält man aber auch zwei Chromopeptide mit 31 und 23.5 kDa.

Das 31 kDa-Chromopeptid beginnt mit A-143 und reicht bis R-426, während sich das Chromopeptid mit 23.5 kDa von I-210 bis R-426 erstreckt. Dieses sehr stabile 23.5 kDa-Fragment verfügt nicht mehr über die Photoreversibilität zwischen der P_r -Form und der gebleichten Form.

3.3. Proteolyse mit Endoproteinase Lys-C

Ein im Vergleich zu Trypsin, das hinter den Aminosäuren K und R spaltet, noch spezifischeres Spaltungsmuster konnte durch die Verwendung der Endoproteinase Lys-C erhalten werden. Sie spaltet ausschließlich hinter K. Beide Phytochromformen, P_r und P_{fr} , wurden einer Abbaukinetik mit 1% (w/w) Endoproteinase Lys-C bei RT unterzogen (Abb. 15).

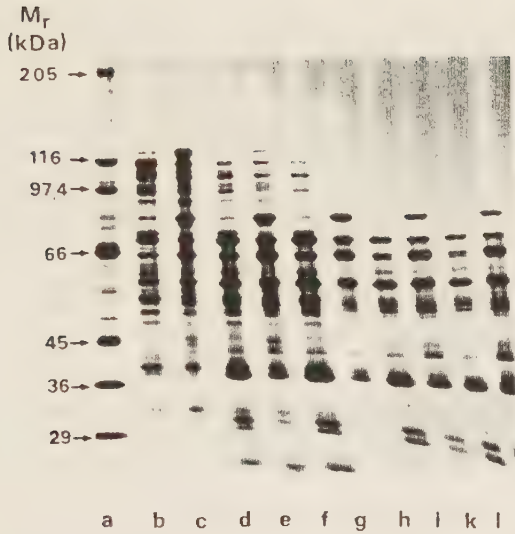


Abb. 15: Endoproteinase Lys-C-Spaltung von Phytochrom. Auftrennung der Peptide im 10% - Gel

a: Markerproteine:

205, 116, 97.4, 66, 45, 36 und 29 kDa

b: P_r -Abbau nach 24 h

c: P_{Ir} -Abbau nach 24 h

d: P_r -Abbau nach 48 h

e: P_{Ir} -Abbau nach 48 h

f: P_r -Abbau nach 70 h

g: P_{Ir} -Abbau nach 70 h

h: P_r -Abbau nach 94 h

i: P_{Ir} -Abbau nach 94 h

k: P_r -Abbau nach 120 h

l: P_{Ir} -Abbau nach 120 h

Signifikante Unterschiede im Abbaumuster beider Phytochromformen sind nach allen Abbauezeiten (24 - 120 h), insbesondere aber nach 70 h zu sehen (Abb. 15, Spuren f und g). In der P_{Ir} -Form tritt deutlich ein 83 kDa-Peptid auf, das in

der P_r-Form fehlt. In der P_r-Form ist eine Doppelbande bei 72/70 kDa zu sehen, während die P_{rr}-Form nur die untere Bande bei 70 kDa aufweist.

Diese Peptide, sowie ein 59 kDa-Peptid aus dem Abbau der P_r-Form wurden nach Auftrennung im Polyacrylamidgel und Elektrobplot auf aktivierte Glasfaser der Sequenzierung unterzogen. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 5: Sequenzierte Fragmente aus dem Abbau mit Endoprotei-nase Lys-C

M _r [kDa] aus Gel	Sequenz	Aminotermina- le Aminosäure	Carboxyterminale Aminosäure +	Berechnetes M _r ++ [kDa]
P _{rr} -Form				
83	blockiert	M-1	K-753	82.8
70	VIA	V66	K-698/K-703	69.6 / 70.2
P _r -Form				
72	LVE	L-48	K-698/K-703	71.7 / 72.3
70	VIA	V-66	K-698/K-703	69.6 / 70.2
59	VIA	V-66	K-593/K-595	58.0 / 58.2

+ Wahrscheinlichste Schnittstelle gemäß M_r-Bestimmung über PAGE.

++ Berechnet aus der Distanz von aminoterminaler zu carboxy-terminaler Aminosäure.

Das N-terminal blockierte 83 kDa-Peptid (M-1 - K-753) aus dem Abbau der P_{rr}-Form entspricht somit dem tryptischen

83 kDa-Peptid. Hiermit wird untermauert, daß der Aminoterminus der P_r -Form im Gegensatz zur P_i -Form vor proteolytischem Angriff stärker geschützt ist. Aus diesem P_r -spezifischen 83 kDa-Fragment entsteht durch Abspaltung von 7.1 kDa vom Aminoterminus und ca. 6 kDa von dessen Carboxyterminus (Abb. 16) ein 70 kDa-Fragment, dessen Sequenz von V-66 bis bis K-698 oder K-703 reicht. Das gleiche 70 kDa-Fragment entsteht auch beim Abbau der P_i -Form.

Bemerkenswert ist das 72 kDa-Fragment, das nur beim Abbau der P_i -Form erscheint. Es beginnt mit L-48 und reicht ebenfalls bis K-698 oder K-703. Die Endoproteinase Lys-C schneidet also nur die P_i -Form hinter K-46, während beide Phytochromformen P_i und P_r anschließend gleichermaßen nach K-65 geschnitten werden.

Das 59 kDa-Fragment entspricht mit seiner Sequenz (V-66 bis K-593 / K-595) dem tryptischen 59 kDa-Fragment.

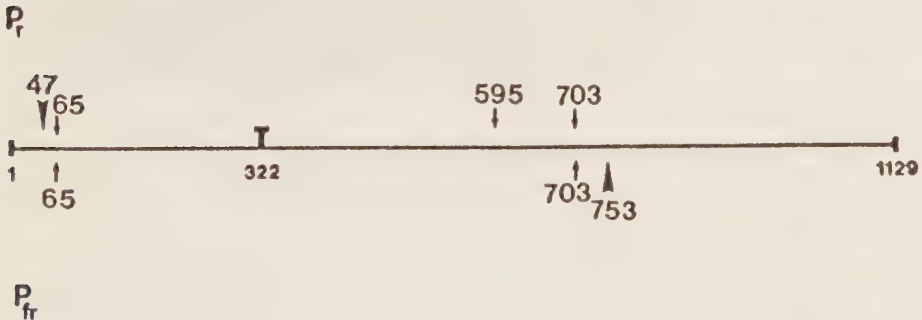


Abb. 16: Charakteristische Schnittstellen der Endoproteinase Lys-C

3.4. Proteolyse mit Endoproteinase Glu-C

Beide Phytochromformen P_r und P_{fr} wurden in gleicher Weise mit 1% (w/w) Endoproteinase Glu-C bei RT inkubiert und einer Abbaukinetik unterzogen. Im Gegensatz zu Lagarias und Mercurio (1985), die nach Inkubation mit 0.2% (w/w) Endoproteinase Glu-C bei 4°C keine Unterschiede im Abbauverhalten von P_r und P_{fr} fanden, sind unter den oben genannten Bedingungen signifikante Unterschiede zu sehen (Abb. 17, Spuren d und e).

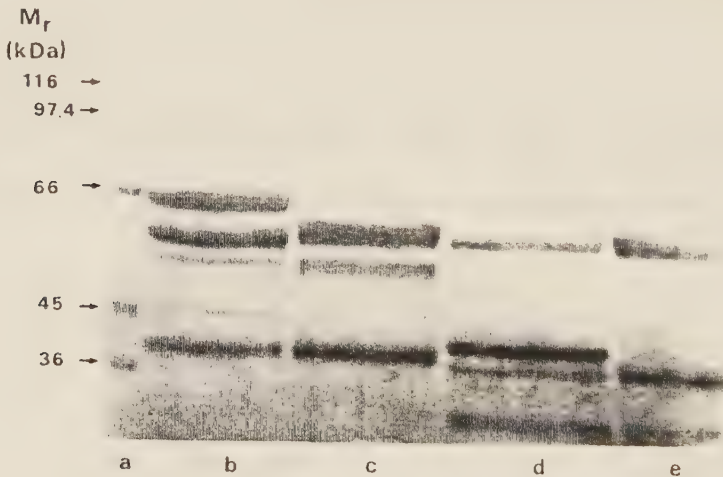


Abb. 17: Abbau von Phytochrom mit Endoproteinase Glu-C und Subtilisin. Auftrennung der Peptide im 10% - Gel, Blot auf Gf

- a: Markerproteine : 116, 97.4, 66, 45 und 36 kDa
- b: Subtilisin-Abbau der P_{fr} -Form nach 10 min. bei RT
- c: Subtilisin-Abbau der P_r -Form nach 10 min. bei RT
- d: Endoproteinase Glu-C-Abbau der P_{fr} -Form nach 30 h bei RT
- e: Endoproteinase Glu-C-Abbau der P_r -Form nach 30 h bei RT

Im Abbaumuster der P_{17} -Form sind markant ein 66 kDa- und ein 40 kDa-Peptid (Abb. 17, Spur d) zu sehen, die im Abbaumuster der P_r -Form fehlen. In der P_r -Form findet man eine Doppelbande bei 59/60 kDa, während in der P_{17} -Form nur die untere Bande zu sehen ist (Abb. 17, Spur e). Die Fragmente sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tab. 6 : Sequenzierte Fragmente aus dem Abbau mit Endoproteinase Glu-C

M_r [kDa] aus Gel	Sequenz	Aminoterminale Aminosäure	Carboxyterminale Aminosäure +	Berechnetes M_r ++ [kDa]
P_{17} -Form				
66	blockiert	M- 1	E-597	65.7
59	KVI	K-65	E-597	58.5
40	blockiert	M- 1	E-354	38.9
P_r -Form				
60	AQR	A-51	E-597	60.1
59	KVI	K-65	E-597	58.5

+ Wahrscheinlichste Schnittstelle gemäß M_r -Bestimmung über PAGE

++ Berechnet aus der Distanz von aminoterminaler zu carboxyterminaler Aminosäure

Die blockierten Aminotermini des 66 kDa-Peptids und des 40 kDa-Peptids, die nur im Abbaumuster der P_{17} -Form auftreten, unterstreichen die Tatsache, daß der Aminoterminus der

P_{1r}-Form vor proteolytischem Angriff geschützt ist. Als C-terminale Aminosäure des 66 kDa-Fragments kann E-597 als sehr wahrscheinlich betrachtet werden, da die nächsten E-Reste E-573 und E-622 mit dem daraus resultierenden M_r der Fragmente von 63 kDa und 68.4 kDa zu sehr von dem über PAGE bestimmten M_r von 66 kDa abweichen.

Die C-terminale Aminosäure des 40 kDa-Fragments ist weitaus schwieriger zu bestimmen, da sich von E-344 bis E-354 ein saurer Cluster mit 6 E-Resten erstreckt. Aufgrund des über PAGE bestimmten M_r von 40 kDa wurde der letzte E-Rest 354 des sauren Clusters als C-Terminus angenommen, da das berechnete M_r mit 38.9 kDa dem bestimmten M_r von 40 kDa am nächsten kommt. Gewiß sind auch die übrigen E-Reste 344, 346, 347, 350 und 352 gleichwertig als mögliche C-Termini des Fragmentes anzusehen. Interessanterweise liegt der Carboxyterminus des blockierten 40 kDa-Peptids unweit der chromophortragenden Aminosäure C-322 (Abb. 18). Er befindet sich am Ende oder innerhalb eines sauren Clusters (E-344 - E-354), wobei der darauffolgende basische Cluster mit der markanten Sequenz K K K K (361-364) weggeschnitten wurde.

Die proteolytische Zugänglichkeit des Aminoterminus der P₁-Form zeigt erneut ein 60 kDa-Fragment, das ausschließlich in der P₁-Form gebildet wird und dessen Aminoterminus A-51 bildet (Abb. 18).

E-597 kann entsprechend dem über PAGE bestimmten M_r von 60 kDa als wahrscheinlichste C-terminale Aminosäure angesehen werden.

Charakteristisch auch beim Abbau mit der Endoproteinase Glu-C ist das Vorfinden einer gemeinsamen Spaltstelle von P₁ und P_{1r} nach E-64 (Abb. 18). K-65 bildet den Aminoterminus beider 59 kDa-Fragmente aus dem Abbau der P₁- und P_{1r}-Form. Auch bei diesen Fragmenten kann E-597 als C-terminale Aminosäure betrachtet werden. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß diese Region in der nativen Proteinkonformation für beide Phytochromformen gleichermaßen zugänglich ist.

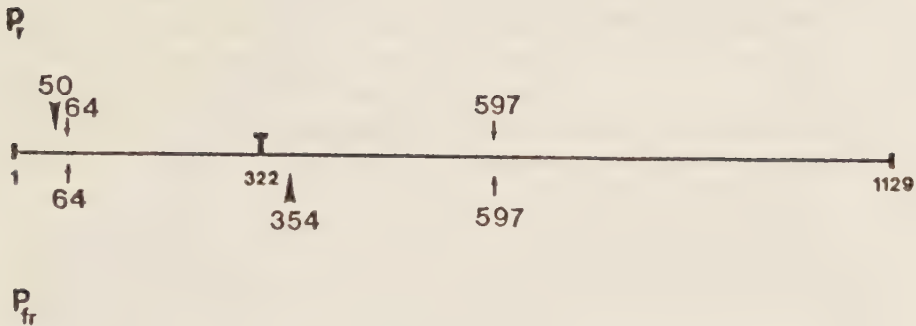


Abb. 18: Charakteristische Schnittstellen der Endoproteinase Glu-C

3.5. Proteolyse mit Subtilisin

Subtilisin weist im Gegensatz zu den hochspezifischen Proteasen Trypsin, Endoproteinase Lys-C und Endoproteinase Glu-C eine geringere Spaltungsspezifität auf. Es spaltet vorwiegend hinter unpolare Aminosäuren.

Der Vergleich von Fragmenten aus dem Subtilisin-Abbau von Phytochrom mit Fragmenten aus dem Abbau mit den hochspezifischen Proteasen kann aber als weiterer schlüssiger Beweis für die Exposition von bestimmten Bereichen innerhalb des Proteins gewertet werden.

So erkennt man im Peptidmuster beider Phytochromformen P_r und P_{fr} nach Inkubation mit 1% (w/w) Subtilisin bei RT bereits nach 10 min. signifikante Unterschiede (Abb. 17, Spuren b und c).

Im Abbaumuster der P_{fr} -Form (Abb. 17, Spur b) ist spezifisch ein 66 kDa-Fragment zu sehen, das in der P_r -Form fehlt (Abb. 17, Spur c). In beiden Formen treten 59 kDa-Banden auf, wobei ausschließlich die P_r -Form eine zusätzliche Bande bei 61 kDa aufweist.

Ebenso tritt nur in der P_r-Form ein Fragment mit 53 kDa auf. Neben den genannten Peptiden wurden auch jeweils die 39 kDa-Fragmente aus beiden Abbaumustern nach Auftrennung über PAGE und Blot auf aktivierte Gf der Sequenzierung unterworfen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Tab. 7: Sequenzierte Fragmente aus dem Subtilisin-Abbau

M _r [kDa] aus Gel	Sequenz	Aminoterminale Aminosäure	Carboxyterminale Aminosäure +	Berechnetes M _r ++ [kDa]
P _r -Form				
66	blockiert	M- 1	L-600	66.0
59	LQMIQK	L-70	L-600	58.3
39	LQMIQK	L-70	L-424	39.0
P _r -Form				
39	LQMIQK	L-70	L-424	39.0

+ Wahrscheinlichste Schnittstelle gemäß M_r-Bestimmung über PAGE

++ Berechnet aus der Distanz von aminoterminaler zu carboxyterminaler Aminosäure

Das 66 kDa-Fragment, das spezifisch im Abbaumuster der P_r-Form auftritt, besitzt einen blockierten Aminoterminus. Es beginnt entsprechend unserer Sequenznummerierung mit M-1. Dies bedeutet, daß auch die relativ unspezifisch nach unpolaren Resten spaltende Protease Subtilisin den Aminoterminus

der P_{Ir} -Form ebenso wenig angreifen kann wie die hochspezifischen Proteasen Trypsin, Endoprotease Lys-C und Endoprotease Glu-C, die nach polaren Resten spalten. Die Schnittstelle des 59 kDa-Fragmentes aus dem P_{Ir} -Abbau, sowie beider 39 kDa-Fragmente aus dem Abbau von P_r und P_{Ir} befindet sich unter Y-69 (Tab. 7, Abb. 19), so daß L-70 die aminoterminalen Aminosäure dieser Fragmente darstellt. Diese gemeinsame Schnittstelle von P_r und P_{Ir} unter Y-69 liegt damit sehr nahe an den Schnittstellen zahlreicher Peptide aus dem proteolytischen Abbau beider Phytochromformen mit den bisher verwendeten Proteasen hinter R-62, E-64 und K-65.

Die C-terminalen Aminosäuren der jeweiligen Fragmente lassen sich durch das relativ unspezifische Spaltungsvermögen von Subtilisin nur annähernd genau über das im PAG bestimmte M_r aus der Distanz von aminoterminaler Aminosäure zu der Aminosäure bestimmen, die dem bestimmten M_r am nächsten kommt.

Für die 66 kDa- und 59 kDa-Fragmente wird L-600 und für die 39 kDa-Fragmente L-424 als C-terminale Aminosäure angenommen (Abb. 19). Die C-Termini dieser Fragmente sind dementsprechend mit gewissen Vorbehalten zu betrachten.

Aufgrund technischer Probleme am Sequenator konnten die aminoterminalen Sequenzen der 59 kDa- und 61 kDa-Fragmente aus dem P_r -Abbau nicht bestimmt werden.

P_r



P_{Ir}

Abb. 19: Charakteristische Schnittstellen von Subtilisin

3.6. Charakterisierung kleiner Chromopeptide

3.6.1. Charakterisierung eines tryptischen 23.5 kDa-Chromopeptids

Inkubiert man natives Phytochrom in der P_r -Form bei Raumtemperatur mit 10% (w/w) Trypsin für 23 h, so erhält man ein 23.5 kDa-Chromopeptid, das das in Abb. 14 dargestellte Absorptionsspektrum aufweist.

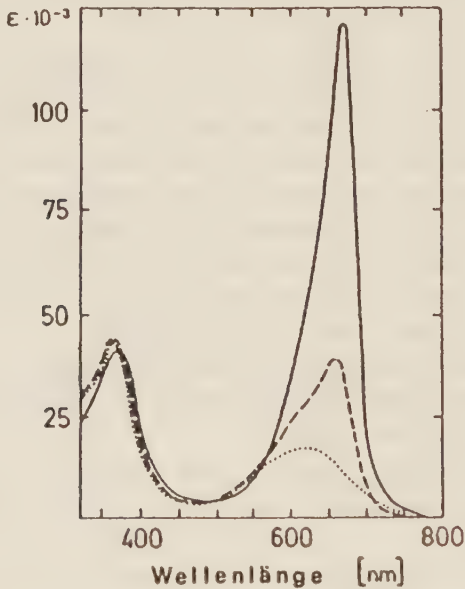


Abb. 14: Absorptionsspektrum des 23.5 kDa-Chromopeptids im Vergleich zum nativen 124 kDa-Phytochrom

- a (—): P_r -Form von 124 kDa-Phytochrom
- b (---): P_r -Form des Abbauprodukts nach Inkubation von a mit 10% Trypsin bei RT für 23 h = 23.5 kDa-Chromopeptid (I-210 - R-426)
- c (.....): b nach saturierender HR-Belichtung

Dieses 23.5 kDa-Fragment, das in der Gesamtpeptidkette zwischen I-210 und R-426 lokalisiert werden kann, weist nach Abbau des nativen Proteins in der P_r -Form im Absorptionsspektrum noch ein $\lambda_{\text{max}} = 654\text{nm}$ mit einem wesentlich kleineren ϵ -Wert als das native 124 kDa-Phytochrom auf (Abb. 14 b). Nach saturierender HR-Belichtung erhält man eine gebleichte Form mit einem Absorptionsmaximum bei 616 nm (Abb. 14 c). Diese gebleichte Form ist nun aber durch DR-Belichtung nicht mehr in die P_r -Form revertierbar; das Chromopeptid ist irreversibel ausgebleicht.

Aus dem Absorptionsverhalten dieses 23.5 kDa-Chromopeptids geht hervor, daß in diesem Fragment nur noch geringe Interaktionen zwischen Proteinkette und Chromophor vorhanden sind und nur noch sehr wenige stabilisierende Reste aus der "nativen" Chromophor-Konformation der P_r -Form übrig geblieben sind, während in der P_{fr} -Form jegliche Stabilisierung verloren ging.

3.6.2. Charakterisierung eines 16 kDa-Chromopeptids aus der Proteolyse mit Subtilisin

Inkubiert man natives 124 kDa-Phytochrom in der P_r -Form bei RT mit 8% (w/w) Subtilisin (Nagarse) für 26 h (nach A. Jones, persönliche Mitteilung), weist der Proteolyseansatz die photoreversiblen Spektraleigenschaften des tryptischen 39 kDa-Chromopeptids mit einem Absorptionsmaximum der P_r -Form bei 660 nm und der anstelle der P_r -Form auftretenden P_{fr} -Form mit einem Absorptionsmaximum bei 654 nm auf (Reiff et al., 1985, Vergleiche auch Abb. 27).

Nach Auftrennung des Proteolyseansatzes über PAGE und anschließendem Elektrophoretogramm auf NC ist über die Fluoreszenz mit Zn^{2+} ein Chromopeptid mit 16 kDa zu sehen, dem von A. Jones (Yamada Konferenz 1986, Japan) aufgrund einer gegenüber dem 23.5 kDa-Peptid N-terminal längeren Sequenz (vgl. Diskussion, S. 119) die Spektraleigenschaften des tryptischen 39 kDa-

Chromopeptids zugeschrieben wurden.

Unter leicht modifizierten Bedingungen [2% (w/w) Protease anstelle von 8% (w/w)] konnte dieser Proteolyseversuch reproduziert werden.

Nach Auftrennung des Inkubationsansatzes über PAGE und Elektrophoretogramm auf aktivierte Gf wurde die aminoterminal Sequenz des 16 kDa-Chromopeptids bestimmt. Sie lautet:

S	L	P	G
212			215

Der Aminoterminus des Fragmentes S-212 geht demnach aus der Spaltung von Subtilisin (Nagarse) hinter Q-211 hervor. Aufgrund des M_r von 16 kDa kann als wahrscheinlichste C-terminale Aminosäure Q-358 angenommen werden.

Somit liegt die Sequenz des 16 kDa-Chromopeptids aus dem Abbau mit Subtilisin (Nagarse) innerhalb der Sequenz des tryptischen 23.5 kDa-Chromopeptids (I-210 - R-425, III.3.2.5.2.). Während das tryptische 23.5 kDa-Chromopeptid im Inkubationsansatz die Photoreversibilität vollständig verloren hat und nach Belichtung irreversibel ausbleicht, ist das 16 kDa-Chromopeptid aus dem Subtilisinabbau im Inkubationsansatz zwischen der P_r -Form und der P_{II} -Form vollständig photoreversibel. Der Schluß liegt nahe, daß die Spektraleigenschaften des 16 kDa-Chromopeptids auf Aggregationsphänomene des Chromopeptids mit anderen Subtilisinfragmenten zurückzuführen sind.

3.7. Zusammenfassung aller Schnittstellen

Faßt man sämtliche aus den unter 3.1. - 3.5. beschriebenen Proteolyseversuchen bestimmten Schnittstellen vom 124 kDa-Phytochrom zusammen und zeichnet sie zum einen in einen Chou-Fasman Sekundärstruktur-Plot (aus Vierstra und Quail, 1986, Abb. 20) und zum anderen in einen Hydropathy-Plot der Polypeptidkette von 124 kDa-Phytochrom (aus Hershey et al., 1985, Abb. 21) ein, so läßt sich folgendes erkennen:

Am Aminoterminal befindet sich ein Segment von 60 Aminosäuren, das ausschließlich in der P_r -Form proteolytisch angegriffen wird. Durch die Vielzahl der gefundenen Schnittstellen in diesem stark hydrophilen Bereich (Abb. 21), ist zu erkennen, daß das gesamte Segment in der P_r -Form wohl mehrfach gespalten wird. Die P_r -spezifischen Schnittstellen sind in verschiedensten Sekundärstrukturbereichen zu finden (Abb. 20).

Es folgt ein kurzes, leicht hydrophobes Segment von R-62 bis Y-69 (Abb. 21), das in beiden Phytochromformen P_r und P_{fr} annähernd gleichmäßig proteolytisch zugänglich ist. Diese gemeinsamen Schnittstellen befinden sich in einem ungeordneten Bereich des Proteins (Abb. 20).

Die weiteren Schnittstellen bis zur Chromophorregion K-142, K-185, K-209 und R-278 sind in beiden Phytochromformen gleichermaßen zugänglich und befinden sich in hydrophoben ungeordneten Bereichen des Proteins (Abb. 20 und 21).

Es folgt eine P_{fr} -spezifische Schnittstelle E-354, die in einem ausgeprägten hydrophilen α -Helix-Bereich nach dem Chromophor zu finden ist (Abb. 20 und 21).

Gemeinsame Schnittstellen sind im weiteren Verlauf der Polypeptidkette zunächst in einem hydrophoben ungeordneten Bereich des Proteins zu finden (L-424, R-426) und anschließend in stark hydrophilen Bereichen von β -Schleifen und ungeordneten Bereichen des Proteins (K-537, K-565, K-595 - L-600, Abb. 20 und 21).

In der C-terminalen Hälfte der Polypeptidkette folgen zu-

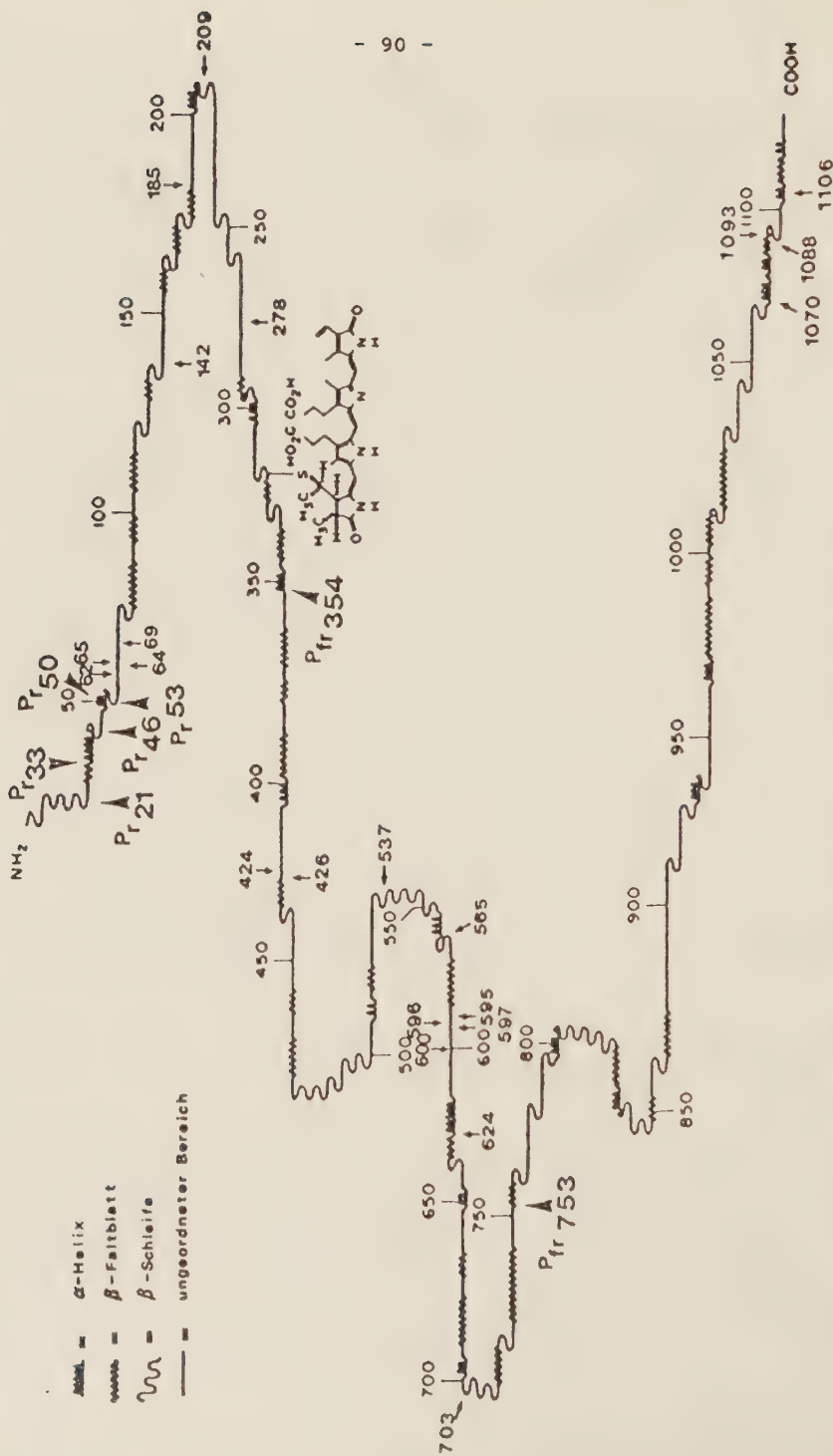


Abb. 20: Gemeinsame (—) und spezifische (—) Schnittstellen von 124 kDa-Phytochrom in P_r- und P_{fr}-Form im Chou-Fasman Sekundärstruktur-Plot

nächst zwei weitere gemeinsame Schnittstellen in stark hydrophoben Bereichen nach R-624 und K-703 / R-704 die sich am Ende von α -Helices befinden (Abb. 20 und 21).

Es folgt eine P_r -spezifische Schnittstelle nach K-753, die sich in einem hydrophoben Bereich am Anfang einer β -Faltblattstruktur befindet.

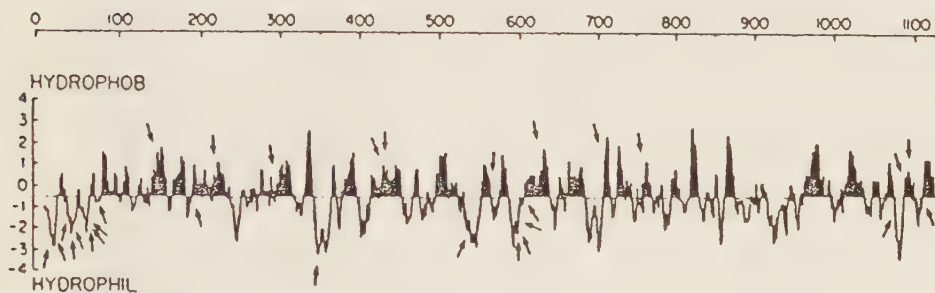


Abb. 21: Proteolytische Schnittstellen ($\rightarrow$) vom 124 kDa-Phytochrom, eingezeichnet in einen Hydropathy-Plot

Am C-terminalen Ende der Polypeptidkette konnte eine gemeinsame Schnittstelle R-1093 / R-1097 in einem hydrophoben Bereich einer β -Schleife identifiziert werden.

Die drei aus dem proteolytischen Abbau der P_r -Form mit endogenen Proteasen stammenden C-terminalen Schnittstellen können aufgrund der unspezifischen Spaltungsreaktionen der Proteasen nur annähernd genau über das durch Elektrophorese bestimmte M_r der Fragmente determiniert werden.

Die postulierten Spaltstellen nach L-1070, L-1088 und L-1106 (siehe Kapitel III.3.1.) befinden sich in neutralen bis leicht hydrophilen α -Helix und β -Faltblattbereichen (Abb. 20 und 21).

4. Lokalisierung der Epitope von monoklonalen Antikörpern

Die exakte Lokalisierung proteolytischer Fragmente innerhalb der Aminosäuresequenz von Phytochrom ermöglichte auch den Versuch, Epitope für verschiedene monoklonale Antikörper zu lokalisieren.

Die Versuche wurden mit 14 verschiedenen m-AK durchgeführt, die mir freundlicherweise von Prof. Schneider, Köln, überlassen wurden. Diese m-AK wurden gegen das "Kleine Phytochrom" und das "124 kDa-Phytochrom" aus Hafer und gegen das 124 kDa-Phytochrom aus Mais produziert (H. Schwarz, 1986). So beziehen sich auch die Buchstaben A und Z am Anfang der Antikörpernummerierung auf ihre Entstehung (A = Avena, Z = Zea). Weiterhin wurden Versuche mit mehreren m-AK durchgeführt, die mir freundlicherweise von Prof. S. Roux, Texas, überlassen wurden. Diese m-AK sind mit dem Buchstaben D und einer fortlaufenden Zahl bezeichnet und charakterisiert (Silberman et al., 1985).

Zur Lokalisierung der Epitope wurden Western-Blotanalysen durchgeführt. Verwendet wurden proteolytische Fragmente aus dem Abbau mit endogenen Proteasen und mit Trypsin, deren Sequenzen bestimmt waren und deren Zuordnung in die Gesamtsequenz zuverlässig durchgeführt werden konnte (III.3.1. und 3.2.). Die positive Reaktion eines Antikörpers im Western-Blot kann als Beweis angesehen werden, daß das entsprechende Epitop, an das der Antikörper bindet, in dem jeweiligen proteolytischen Fragment mit bekannter Sequenz vorhanden sein muß. Eine negative Reaktion im Western-Blot kann als Fehlen des Epitops in einem Fragment gewertet werden.

Die Reaktionen der verschiedenen m-AK auf die proteolytischen Fragmente sind in den Tabellen 8 a) und b) zusammengefaßt.

Sämtliche untersuchte m-AK reagieren mit 124 kDa-Phytochrom und dem 118 kDa-Fragment aus dem Abbau mit endogenen Proteasen. Da dieses Fragment 33 Aminosäuren vom Aminoterminal und ca. 20 Aminosäuren vom Carboxyterminus verloren hat, liegt

Tab. 8: Reaktionen der proteolytischen Fragmente mit diversen m-AK. Im Western-Blot zeigen positive Reaktionen (+) die Anwesenheit des korrespondierenden Epitops an, negative Reaktionen (-) ihre Abwesenheit. Die Fragmente stammen aus dem Abbau mit endogenen Proteasen (A) oder Trypsin (B).

a)

Fragment- größe (kDa)	Ursprung	Reaktion mit m-AK							
		A-2A3	Z-2D2	Z-2B4	Z-4A5	Z-2A3	Z-3A6	Z-3B1	Z-1C4
124		+	+	+	+	+	+	+	+
118	A	+	+	+	+	+	+	+	+
116	A	-	-	-	-	+	+	+	+
114	A	-	-	-	-	-	-	+	+
59	B	-	-	-	-	-	-	+	+
39	B	-	-	-	-	-	-	+	+
31	B	-	-	-	-	-	-	+	-
23.5	B	-	-	-	-	-	-	+	+

Tab. 8 b):

Fragment- größe (kDa)	Ursprung	Reaktion mit m-AK						
		Z-2B3	Z-4B5	Z-6D5	A-1B3	A-CC5	A-PD4	D-16
124		+	+	+	+	+	+	+
118	A	+	+	+	+	+	+	+
113	B	-	-	-	+	+	+	+
83	B	+	+	+	+	+	+	+
59	B	+	+	+	+	+	+	-
55	B	+	+	+	+	+	+	+
52	B	+	+	+	-	-	-	-

der Schluß nahe, daß kein untersuchter AK direkt gegen N- oder C-Terminus gerichtet ist.

Das Epitop der m-AK A-2A3, Z-2D2, Z-2B4 und Z-4A5, die das 118 kDa-Fragment aber nicht mehr das 116 kDa-Fragment erkennen, muß demnach in dem 2 kDa-Fragment lokalisiert sein, das vom 118 kDa- zum 116 kDa-Fragment abgeht. Gemäß der Sequenzanalyse (III.3.1.) muß dieses Epitop zwischen den Aminosäuren 1088 - 1106 lokalisiert sein (Abb. 22).

Gleichermaßen kann das Epitop für die m-AK Z-2A3 und Z-3A6, die das 116 kDa-Fragment erkennen, aber nicht mehr das 114 kDa-Fragment, zwischen den Aminosäuren 1070 und 1088 lokalisiert werden (Abb. 22).

Die m-AK Z-2B3, Z-4B5 und Z-6D5 erkennen das 118 kDa-Fragment (34 - 1106), nicht aber das 113 kDa-Fragment (54/63/66 - 1093/1097). Da diese drei m-AK aber das 83 kDa-Fragment (1 - 753) erkennen, muß das Epitop dieser m-AK zwischen den Aminosäuren 34 - 54 lokalisiert sein (Abb. 22).

Das Epitop für die m-AK A-1B3, A-CC5 und A-FD4 kann zwischen den Aminosäuren 537 - 565 lokalisiert werden (Abb. 22), da sie das 59 kDa-Fragment (66 - 595) und das 55 kDa-Fragment (66 - 565) erkennen, aber nicht mehr das 52 kDa-Fragment (66 - 537).

Der m-AK D-16 erkennt das 113 kDa-Fragment (54/63/66 - 1093/1097) und ein 55 kDa-Fragment (63/66 - 565 oder 597 - 1093/1097). Da aber das 59 kDa-Fragment (63/66 - 595/596) und die 52 kDa-Fragmente (625 - 1093/1097, 63/66 - 537) nicht erkannt werden, ist das Epitop dieses m-AK zwischen den Aminosäuren 597 - 625 zu suchen (Abb. 22).

Der m-AK Z-1C4 reagiert mit dem 39 kDa-Fragment (66 - 426) und einem 23.5 kDa-Fragment (66 - 278 oder 210 - 426). Da er aber nicht das 31 kDa-Fragment (143 - 426) erkennt, kann sein Epitop zwischen den Aminosäuren 66 - 143 zugeordnet werden (Abb. 22).

Der m-AK Z-3B1, der auch mit Phytochrom aus Spinat (eigene Untersuchungen) und mit Phytochrom aus anderen Dikotyledo-



Abb. 22: Schematische Zeichnung der Peptidkette von 124 kDa-Haferphytochrom. Vertikale Markierungen mit Nummern darüber kennzeichnen die proteolytischen Schnittstellen von Trypsin und von den endogenen Proteasen aus Hafer. Sieben verschiedene Regionen (I - VII) wurden als Bindungsstellen für monoklonale Antikörper identifiziert.

nen, Farnen und Moosen kreuzreagiert (Schneider, Schwarz Grimm, Rüdiger, in press), erkennt sämtliche Chromopeptide bis zum 23.5 kDa-Fragment (210 - 426). Sein Epitop muß also dem Bereich zwischen den Aminosäuren 210 - 426 zugeordnet werden. Bei genauer Betrachtung dieses Peptids fällt auf, daß es die carboxyterminale Schnittstelle des anderen 23.5 kDa-Peptids R-278 beinhaltet (III.3.2. und Abb. 13). Da Epitope auf der Oberfläche eines Proteins lokalisiert sein müssen und der Proteinteil zwischen L-279 und R-426 mit dem Phytochromobilin-Chromophor und der für Trypsin nicht zugänglichen Sequenz K K K K (361 - 364) ins Innere des Proteins gerichtet sein müssen, kann das Epitop für den m-AK Z-3B1 weiter auf den Bereich zwischen den Aminosäuren 210 - 278 eingegrenzt werden (Abb. 22).

So konnten also bisher 7 verschiedene Bereiche im Phytochromprotein als Bindungsstellen für diverse m-AK identifiziert und lokalisiert werden.

Dieser Weg Epitope monoklonaler Antikörper über Western-Blotanalyse mit proteolytischen Fragmenten bekannter Sequenz und exakter Zuordnung in die Gesamtsequenz zu lokalisieren, ermöglichte eine verbesserte und genauere Epitoplokalisierung als in der Literatur bisher beschrieben (Daniels and Quail, 1984, Silberman et al., 1985, Vierstra et al., 1984).

In Inhibierungsversuchen mit gleichen oder unterschiedlichen m-Ak, die von H. Schwarz an der Universität Köln durchgeführt wurden, konnte u.a. gezeigt werden, daß sich die m-Ak Z-3A6, Z-4B5, Z-2B3 und Z-6D5 gegenseitig bei der Bindung an ihr Epitop hemmen.

Das bedeutet, daß diese m-Ak das gleiche Epitop erkennen oder ihre Epitope sterisch nahe beieinander liegen. Für diese m-Ak wurden aber über Western-Blot zwei verschiedene Epitope lokalisiert. Sie befinden sich in der denaturierten Peptidkette nahe dem Aminoterminus (Region I für die m-Ak

Z-4B5, Z-2B3, und Z-6D5, Abb. 22) und nahe dem Carboxyterminus (Region V für den m-Ak Z-3A6, Abb. 22). Da sich die m-Ak aber im Hemm-ELISA, der mit Phytochrom in seiner nativen Tertiärstruktur durchgeführt wird, gegenseitig inhibieren, liegt der Schluß nahe, daß der Aminoterminal- und der Carboxyterminus der Peptidkette im nativen Phytochrom-Dimeren relativ nahe beieinander liegen.

5. Phosphorylierung von Phytochrom

Die Phosphorylierung von Proteinen stellt einen wirkungsvollen Mechanismus zur Regulierung ihrer Aktivität dar (Trewavas, 1976). So erschien es interessant zu überprüfen, ob Phytochrom - insbesondere in der P_{fr} -Form - als ein möglicher Schritt in der Signaltransduktion zwischen P_{fr} -Bildung und photomorphogenetischer Reaktion selbst phosphoryliert wird. Wong et al. (1986) zeigten bereits in Phosphorylierungsversuchen mit Säugetierkinasen, daß Phytochrom phosphoryliert werden kann. In der P_r -Form stellte man dabei eine stärkere Phosphorylierung fest als in der P_{fr} -Form.

In Zusammenarbeit mit Th. Priester von der Arbeitsgruppe Prof. Hager, Botan. Institut der Universität Tübingen, wurden zunächst Versuche zur Phosphorylierung von Phytochrom mit einer pflanzlichen Kinase und Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen durchgeführt. Verwendet wurden partiell gereinigte Kinasepräparationen, die aus den aktiven Plasmalemma-Zonen einer Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation eines Rohextraktes von Koleoptilen 5 Tage alter etiolierter Maiskeimlinge hervorgingen.

Bei Versuchen mit zwei gereinigten Phytochromproben in unterschiedlichen Puffern (10 mM KPP pH 7.8 und 10 mM Hepes pH 7.8) mit zwei unterschiedlichen Plasmalemma-Kinasepräparationen wurden jeweils übereinstimmende Resultate erzielt (Tab. 9).

Tab. 9: Einbau von ^{32}P in verschiedene Versuchsansätze

Phytochrom	Substrat	cpm/min	rel. Einbau [%]
P_r/P_{Tr}	----	1011 ± 155	101.1
Peptide	----	1061 ± 72	106.1
----	----	1000 ± 25	100
----	Histon	5771 ± 267	100
P_r/P_{Tr}	Histon	3937 ± 14	68.2
Peptide	Histon	5945 ± 11	103
P_r	----	1176 ± 40	117.2
P_{Tr}	----	1141 ± 128	113.8
----	----	1003 ± 13	100
P_r	Histon	3847 ± 388	72.1
P_{Tr}	Histon	4065 ± 43	76.2
----	Histon	5337 ± 80	100

Ohne Zugabe von Substrat führt Phytochrom in allen untersuchten Fällen zu einer erhöhten Einbaurrate von ^{32}P in Protein. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Phytochrom selbst und ein 60 kDa-Protein außerordentlich stark phosphoryliert werden (Abb. 23 b, Spur 1). Phytochrom in der P_r -Form wird dabei stärker phosphoryliert als in der P_{Tr} -Form (Abb. 23 b, Spuren 5 und 8 und Tab. 9).

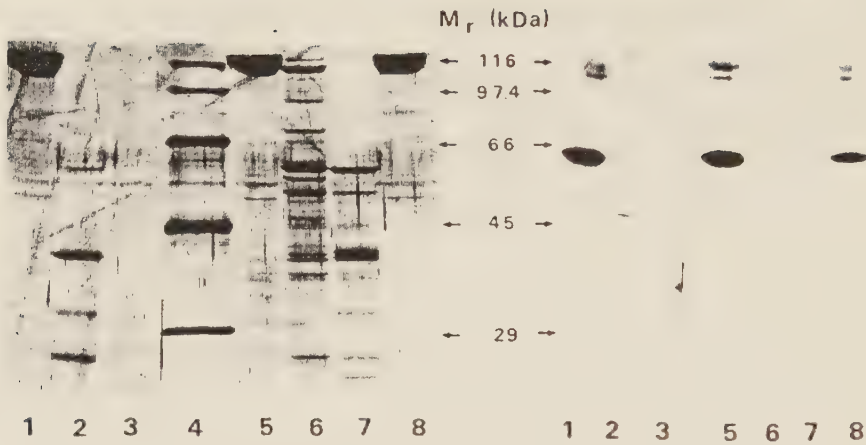


Abb. 23: Auftrennung der Kinase-Ansätze ohne Zusatz von Substrat im 15% - Polyacrylamidgel

a) Silberfärbung

b) Autoradiogramm

- 1 124 kDa-Phytochrom, P_r / P_{tr} im Weißlicht
- 2 Tryptische Peptide von Phytochrom
- 3 Kinasepräparation
- 4 Markerproteine: 116, 97.4, 66, 45 und 29 kDa
- 5 124 kDa-Phytochrom, P_r -Form
- 6 Trypsinabbau (1 % w/w, 1 min., RT) nach Phosphorylierung von 124 kDa-Phytochrom
- 7 Trypsinabbau (10% w/w, 10 min., RT) nach Phosphorylierung von 124 kDa-Phytochrom
- 8 124 kDa-Phytochrom, P_{tr} -Form

Zur Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen im Phytochromprotein wurde natives Phytochrom im Anschluß an die ^{32}P - Markierung einer tryptischen Proteolyse unterzogen (Abb. 23 a, Spuren 6 und 7). Markierte Peptide waren im Autoradiogramm nicht sichtbar (Abb. 23 b, Spuren 6 und 7). Da natives 124 kDa-Phytochrom phosphoryliert wurde, das 113 kDa-

Fragment (S-63/V-66 - R-1093) aus dem tryptischen Abbau im Autoradiogramm aber nicht sichtbar war, sind die Phosphorylierungsstellen am Aminoterminus von M-1 bis R-62 und bzw. am Carboxyterminus ab N-1094 zu suchen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Resultaten der Phosphorylierungsversuche von Wong et al. (1986), die mit den Proteinkinasen C und G, sowie mit der phytochromassozierten polykationenabhängigen Proteinkinase eine wesentlich stärkere Phosphorylierung der P_r -Form gegenüber der P_{tr} -Form erhielten. Die Autoren konnten die Phosphorylierungsstelle in diesem Fall in den ersten 10 kDa vom Aminoterminus des nativen Proteins ausgehend lokalisieren.

Im Gegensatz dazu stehen deren Ergebnisse mit der Proteinkinase A, die beide Phytochromformen P_r und P_{tr} gleichermaßen stark phosphoryliert, wenn sich auch die Phosphorylierungsstellen im Protein voneinander unterscheiden. Dabei ist die bevorzugte Phosphorylierungsstelle in der P_r -Form in den aminoterminalen 10 kDa, jedoch in der P_{tr} -Form zwischen 69 - und 84 kDa vom Aminoterminus ausgehend lokalisiert (Wong et al., 1986).

Die eigenen Markierungsversuche der tryptischen Phytochrompeptide mit 40, 31 und 23.5 kDa (Abb. 23a, Spur 2) zeigten keinen ^{32}P -Einbau (Abb. 23 b, Spur 2).

In Gegenwart von Histon kam es in eigenen Versuchen zu einer Hemmung des ^{32}P -Einbaus in Phytochrom (Tab. 9). Diese Hemmung konnte in Zusatzversuchen damit erklärt werden, daß natives Phytochrom mit dem Substrat Histon rasch in etwa äquimolaren Mengen präzipitiert. Dies ist eine spezifische Eigenschaft des nativen Phytochroms, da die tryptischen Peptide nicht reagieren.

Die tryptischen Peptide, die selbst nicht phosphoryliert wurden, haben auch keinen Einfluß auf die Phosphorylierung der Histone (Abb. 24 b, Spur 3).

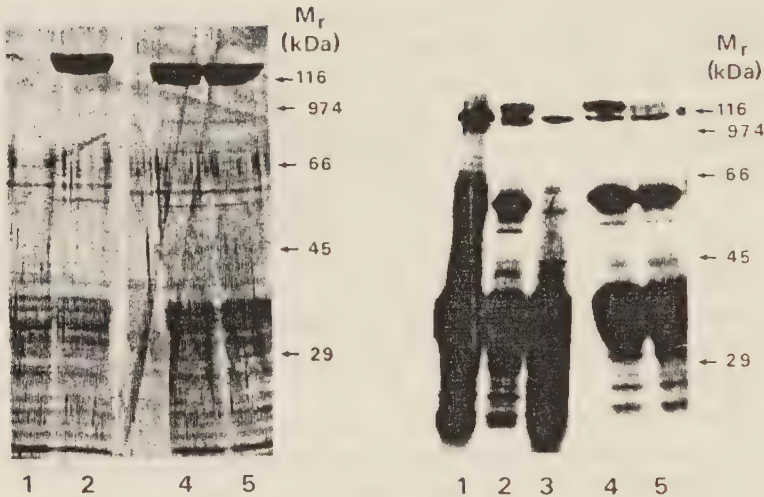


Abb. 24 a: Auftrennung der Kinase-Ansätze mit Histon als Substrat im 15% - Polyacrylamidgel

a) Silberfärbung

b) Autoradiogramm

- 1 Kinasepräparation
- 2 124 kDa-Phytochrom, P_r / P_{tr} im Weißlicht
- 3 Tryptische Peptide von Phytochrom (Spur fehlt in Gel a)
- 4 124 kDa-Phytochrom, P_r -Form
- 5 124 kDa-Phytochrom, P_{tr} -Form

Trotz der Interaktion von Histon mit nativem Phytochrom während der Versuchsansätze, ist im Autoradiogramm nach Auftrennung der Proben im Gel eine Phosphorylierung von Phytochrom zu sehen. Die P_{tr} -Form erscheint dabei stärker phosphoryliert als die P_r -Form (Abb. 24 b, Spuren 4 und 5). Von augenscheinlicher Auffälligkeit ist, daß in beiden Ansätzen das 60 kDa-Protein gleich stark phosphoryliert wurde (Abb. 24b, Spuren 4 und 5), obwohl es im silbergefärbten Gel (Abb. 24 a, Spuren 4 und 5) nicht zu erkennen ist. Dieses

60 kDa-Protein, das in der stärker konzentrierten Probe tryptischer Peptide im silbergefärbten Gel (Abb. 23 a, Spur 2) schwach zu erkennen ist, wird aber nur in Gegenwart von beiden nativen Phytochromformen phosphoryliert. In Gegenwart der tryptischen Peptide von Phytochrom wird es aber nicht phosphoryliert (Abb. 23 b, Spur 2). Nach Inkubation bereits phosphorylierter Ansätze mit Trypsin (Abb. 23 a, Spuren 6 und 7) erkennt man im Autoradiogramm (Abb. 23 b, Spuren 6 und 7), daß das phosphorylierte 60 kDa-Protein fehlt. Bei diesem 60 kDa-Protein kann es sich also um ein von nativem Phytochrom abhängiges gutes Substrat für Kinaseaktivitäten oder um eine autophosphorylierte Kinase handeln. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß das 60 kDa-Protein im nativen Zustand eine exponierte, kurze terminale Sequenz besitzt, die sich stark phosphorylieren läßt. Nach tryptischer Abspaltung dieses kurzen phosphorylierten Segmentes ist das nicht-phosphorylierte Restprotein im Autoradiogramm nicht mehr zu sehen.

Dieser Effekt würde auch die Beobachtungen erklären, daß in dem Inkubationsansatz der Peptide, die durch tryptische Spaltung einer 124 kDa-Phytochrompräparation erhalten wurden, keine Phosphorylierung des 60 kDa-Proteins festzustellen war, da die kurze Sequenz bereits tryptisch abgespalten wurde.

Wong et al. (1986) stellten bei den Phosphorylierungsversuchen von Phytochrom mit drei verschiedenen Säugetierkinasen in Kontrollansätzen fest, daß gereinigte Phytochromlösungen in Gegenwart bestimmter Polykationen wie Histon H 1 oder Polylysin endogene Proteinkinase-Aktivitäten zeigten.

Sie fanden zudem, daß diese phytochromassoziierte Kinase-Aktivität zu einer 2.5 - 4 fach stärkeren ^{32}P - Inkorporation der P_i -Form im Gegensatz zu der P_{ii} -Form führt. Aufgrund dieser Ergebnisse erschien es interessant nachzuprüfen, ob die nach der eigenen Isolierungsmethode präparierten Phytochromlösungen ebenfalls endogene Kinase-Aktivitäten zeigen.

Außerdem blieb die Frage zu klären, ob die festgestellte Kinase-Aktivität eine Eigenschaft des Phytochroms selbst darstellt oder von einer Proteinkinase als mitgereinigtes Kontaminationsprotein stammt.

Für diese Untersuchungen wurden reine Phytochromlösungen in P_r - und P_{tr} -Form in 10 mM Tricin-Puffer pH 7.8 in Gegenwart von 25 mM Manganchlorid und ^{32}P -ATP mit und ohne Histone als Substrat für 30 min. bei 30°C inkubiert.

Unter diesen Inkubationsbedingungen, die insbesondere von den von Wong et al. (1986) gewählten Pufferbedingungen abweichen, zeigte sich, daß reine Phytochromlösungen auch ohne jegliche Polykationenstimulation endogene Kinase-Aktivitäten besitzen (Abb. 25, Spuren a und b). In Übereinstimmung mit Wong et al. (1986) zeigte die P_r -Form eine wesentlich stärkere Autophosphorylierung (Abb. 25, Spur a) als die P_{tr} -Form (Abb. 25, Spur b).

In Gegenwart einer exogenen Kinase aus der Chloroplasten-Hüllmembran und polykationischer Histone wurde durch die Phosphorylierung der Histone eine Abnahme der Phosphorylierung von nativem 124 kDa-Phytochrom in der P_r -Form beobachtet (Abb. 25, Spur c). Ein geringer Einbau von ^{32}P war auch in der P_{tr} -Form zu sehen (Abb. 25, Spur e).

Phytochrompräparationen, die durch endogene Proteasen vom nativen 124 kDa-Phytochrom zum 118/114 kDa-Phytochrom abgebaut wurden, zeigten unter den gewählten Bedingungen keine Proteinkinase-Aktivitäten mehr (D. Gast, R. Grimm und W. Rüdiger, unveröffentlicht).

Als Ergebnis dieser Untersuchungen kann gefolgert werden, daß wahrscheinlich das native 124 kDa-Phytochrom in der P_r -Form selbst eine Proteinkinase ist.

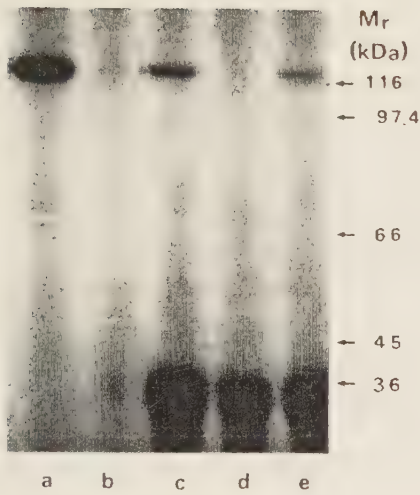


Abb. 25: Autophosphorylierungsansätze von 124 kDa-Phytochrom, Autoradiogramm

- a: 124 kDa-Phytochrom, P_r -Form ohne Histon und Kinase
- b: 124 kDa-Phytochrom, P_{fr} -Form ohne Histon und Kinase
- c: 124 kDa-Phytochrom, P_r -Form mit Histon und Kinase
- d: Histon und Kinase
- e: 124 kDa-Phytochrom, P_{fr} -Form mit Histon und Kinase

6. Versuche zur Kristallisation von Phytochrom

Würde es gelingen Phytochrom zu kristallisieren, so könnte man durch röntgenkristallographische Untersuchungen einen sehr wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Struktur und vor allem zur Funktion von Phytochrom leisten.

Für die Untersuchungen der Röntgenkristallographie, die die einzige Methode ist, die dreidimensionale Position der meisten Atome in einem Protein zu lokalisieren, werden aber vor allem geeignete Proteinkristalle benötigt.

Verschiedenste Strategien wurden inzwischen entwickelt, die Kristallisation von Makromolekülen zu induzieren (A. Pherson, 1982).

Aus der Vielzahl dieser Strategien wurde die Methode der "Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen" ausgewählt. Die Vorteile dieser Methode sind der geringe Verbrauch an Protein (ca. 10 μ l Proteinelösung), leichte technische Handhabung, schnelles Kristallwachstum (3 - 4 Tage) und einfache Überprüfung der Kristallisationsansätze unter dem Mikroskop.

Für die Ansätze zur Kristallisation von Phytochrom wurden nur Proben mit einem SAR > 0.90 und einer Proteinkonzentration von 0.8 - 1.0 mg / ml verwendet.

Auf eine grundsätzliche Schwierigkeit Phytochrom zu kristallisieren sollte noch hingewiesen werden. In der Regel sind Kristallisationsansätze nur dann erfolgversprechend, wenn Proteinelösungen mit einer Konzentration von 5 - 30 mg / ml vorhanden sind (A. Pherson). Dies ist jedoch bei nativem Phytochrom bisher nicht verifizierbar, da es starke Aggregationseigenschaften besitzt und in üblichen Puffersystemen wie Phosphat, Tris, Ammoniumcarbonat oder Hepespuffer nicht stärker als 1 - 1.5 mg / ml konzentriert werden kann.

6.1. Kristallisationsansätze im Weißlicht und bei Raumtemperatur

Zu Beginn der Versuche sollten gewissermaßen als Vorversuche Kristallisationsansätze im Weißlicht durchgeführt werden, um das Verhalten des Proteins zu beobachten. Kristallisationsansätze wurden mit Phytochrom in 10 mM KPP, 2 mM DTT pH 7.5 und pH 8.0 und in 2 mM Hepes, 2 mM DTT pH 7.5 und pH 8.0 durchgeführt.

Um die Löslichkeit des Proteins nach und nach an sein Minimum heranzuführen, wurden die Konzentrationen von folgenden präzipitierenden Substanzen langsam erhöht, die in Tab. 10 aufgezeichnet sind.

Tab. 10: Substanzen, die für die Kristallisation verwendet wurden

Ammoniumsulfat pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0 und pH 10.0

Natriumcitrat pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0 und pH 10.0

Kaliumphosphat pH 7.5 und pH 8.0

PEG 6000 pH 7.5 und pH 8.0

PVP 40 pH 7.5 und pH 8.0

Tris / HCl pH 7.5 und pH 8.0

Die Kristallisationsansätze wurden zunächst bei RT und anschließend bei 4°C durchgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche im Weißlicht sind in Tab. 11 zusammengefaßt. In allen Fällen zeigte sich beim Übergang innerhalb geringer Konzentrationsbereiche, daß Phytochrom nicht langsam zu präzipitieren begann, sondern es zu einem massiven Niederschlag im Tropfen kam. Eine wichtige Erkenntnis daraus ist, daß die relativ gering vorhandene Phytochrom-Proteinkonzentration von 0.8 - 1.0 mg / ml ausreicht, Effekte unter diesen Kristallisationsbedingungen zu erzielen.

Im Kristallisationsverhalten zeigten sich bei unterschiedlichem pH der Phytochromproben keine Unterschiede.

Beim Wechsel von Phosphatpuffer zu Hepespuffer traten jedoch Unterschiede im Verhalten von Phytochrom auf. Dies zeigte sich durch geringeres Präzipitationsvermögen von Phytochrom in Hepespuffer bei adäquater Salzkonzentration der verschiedenen Kristallisationsmedien (Tab. 11). Dieser Effekt beruht möglicherweise darauf, daß Phosphat für sich bereits kristallisierend wirken kann und sich störend auf die kristallisierende Wirkung anderer Salze auswirkt.

Ein weiterer Effekt ist, daß Phytochrom im zwitterionischen organischen Hepespuffer etwas besser löslich ist als im anorganischen Phosphatpuffer. Die zwitterionischen Moleküle sättigen wohl die Oberflächenladungen des Proteins besser ab. Dadurch wird das Aggregationsvermögen des Proteins herabgesetzt und seine Löslichkeit erhöht.

Tab. 11: Kristallisationsversuche im Weißlicht bei RT., Präzipitationsbereich von Phytochrom gegenüber diversen Salzen

Kristallisationsmedium	Präzipitationsbereich von Phytochrom in KPP pH 7.5 und pH 8.0	Präzipitationsbereich von Phytochrom in Hepes pH 7.5 und pH 8.0
KPP pH 7.5/8.0	15 - 20 mM	100 mM
20 % PVP 40 in 10 mM Tris pH 7.5 und pH 8.0	15 mM	> 1 M
20 % PEG 6000 in 10 mM KPP pH 7.5 und pH 8.0	15 mM	> 1 M
Ammoniumsulfat pH 6.0 pH 7.0 pH 8.0 pH 9.0 pH 10.0		0.05 - 0.1 M 0.1 - 0.2 M 0.2 - 0.3 M 0.1 - 0.2 M 0.3 - 0.4 M
Natriumcitrat pH 6.0 pH 7.0 pH 8.0 pH 9.0 pH 10.0		0.05 - 0.1 M 0.1 - 0.2 M 0.2 - 0.3 M 0.1 - 0.2 M 0.3 - 0.4 M

6.2. Kristallisationsansätze von P_r und P_{Ir} bei 4°C

Nach den anfänglichen Kristallisationsversuchen im Weißlicht wurden sämtliche weitere Ansätze mit beiden Phytochromformen P_r und P_{Ir} in 2 mM Hepes, 2 mM DTT pH 8.0 bei 4°C im Dunkeln bzw. unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt.

Als weiteres Kristallisationsmedium wurde auch 80% Ethanol verwendet. Die Ergebnisse der Kristallisationsansätze sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

Generell fällt auf, daß Phytochrom bereits bei relativ niederen Konzentrationen an Ammoniumsulfat und Citrat präzipitiert, wobei die P_{Ir} -Ansätze bei etwas höheren Salzkonzentrationen präzipitieren.

Ähnlich wie bei den Kristallisationsansätzen im Weißlicht, kommt es bei den getrennten Formen P_r und P_{Ir} , im Dunkeln zu meist massiven Präzipitationen.

Der geringe Präzipitationsbereich von 18 - 21 mM Tris pH 8.0 in Gegenwart von 2% PVP 40000, der ausschließlich in der P_r -Form auftritt, ist signifikant. In diesem Bereich laufen unter leicht modifizierten Bedingungen Kristallisationsversuche weiter, da auch der Faktor Temperatur bzw. mehrfacher Temperaturwechsel mitberücksichtigt werden soll.

Tabelle 12: Kristallisationsansätze im Dunkeln bei 4°C. Präzipitationsbereich von Phytochrom in P_r- und P_{fr}-Form

Kristallisations- medium	Präzipitationsbereich	
	P _r -Form	P _{fr} -Form
Ammoniumsulfat		
pH 6.0	0.08 - 0.11 M	< 0.05 M
pH 7.0	0.08 - 0.11 M	0.11 - 0.14 M
pH 8.0	0.05 - 0.08 M	0.11 - 0.14 M
pH 9.0	0.11 - 0.14 M	
pH 10.0	0.08 - 0.11 M	0.11 - 0.14 M
Citrat		
pH 6.0	0.08 - 0.1 M	0.08 - 0.1 M
pH 7.0	0.08 - 0.1 M	0.08 - 0.1 M
pH 8.0	0.06 - 0.08 M	0.1 - 0.12 M
pH 9.0	0.06 - 0.08 M	0.1 - 0.12 M
pH 10.0	0.08 - 0.1 M	0.1 - 0.12 M
20% PEG in 10 mM Tris pH 8.0	100 mM	---
2% PVP in 10 mM Tris pH 8.0	18 - 21 mM	30 - 40 mM
Tris pH 8.0	50 mM	50 mM
80% Ethanol	80%	80%

VI. DISKUSSION

1. Zur Isolierung von Phytochrom

Um den molekularen Mechanismus verschiedenster Phytochromregulierter Reaktionen in Pflanzen zu verstehen, ist es von großer Bedeutung die Struktur des Photorezeptors aufzuklären.

Dazu ist allerdings die Isolierung und Reinigung des Moleküls in seinem nativen Zustand notwendig, wie er in der lebenden Zelle zu finden ist.

Seit der Identifizierung des Proteincharakters von Phytochrom (Butler et al., 1959) wurden daher zahllose Isolierungsverfahren entwickelt.

Im Laufe der Jahre wuchs mit der Verfeinerung proteinchemischer Isolierungs- und Reinigungstechniken auch die Größe des Photorezeptors. Während 1966 noch ein Chromoprotein mit 60 kDa isoliert wurde (Mumford und Jenner), erhielt man durch die seit 1971 beschriebenen Isolierungsverfahren von Phytochrom aus Hafer und Roggen ein Molekül mit einem M_r von 118/114 kDa (Gardner et al., 1971, Rice et al., 1973). Durch die Anwendung von Immunoaffinitätschromatographie und Affinitätschromatographie an Agarose-immobilisierten Cibacron Blue 3GA Farbstoff (Hunt und Pratt, 1979, Smith und Daniels, 1981) konnte sowohl die Ausbeute an gereinigtem Phytochrom erhöht werden als auch der Zeitaufwand für die Isolierung verkürzt werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß auch das 118 / 114 kDa-Phytochrom artefiziell durch eine P₈-spezifische in vitro-Proteolyse aus einem Molekül mit 124 kDa hervorgeht (Vierstra und Quail, 1982), wurden 1983 die ersten Isolierungsverfahren für das 124 kDa-Phytochrom beschrieben (Kerscher, 1983, Vierstra und Quail, 1983, Litts et al., 1983).

Das isolierte 124 kDa-Phytochrom, das mit seinem M_r dem in vitro-Translationsprodukt entspricht (Bolton und Quail,

1982), wird als Protein in seiner nativen Größe betrachtet (Quail et al., 1983).

Inzwischen wurde auch Phytochrom mit einem monomeren M_r von bis zu 160 kDa gefunden, allerdings als ein Phytochrom-Ubiquitin-konjugat, das bei der HR induzierten P_{fr}-spezifischen Phytochromdestruktion via Ubiquitin gebildet wird (Shanklin et al., 1987).

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Isolierungsverfahren für das native 124 kDa-Phytochrom (Vierstra und Quail, 1983, Litts et al., 1983, Datta und Roux, 1985) stellt die von mir entwickelte Methode wohl eines der einfachsten und effizientesten Verfahren dar (Kapitel III.1.).

Der Verzicht auf Immunoaffinitätschromatographie, Affinitätschromatographie an Affi-Gel Blue, Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie ermöglicht es bei einem einzigen Adsorptionschromatographieschritt an HA, Phytochrom aus 3 - 4 kg frischen Materials innerhalb von 16 Stunden mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 25% in reiner nativer Form zu gewinnen.

Das selbstentwickelte Isolierungsverfahren scheint für das 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer hochspezifisch zu sein, da es weder für die Isolierung von grünem Haferphytochrom (eigene Untersuchungen, nicht beschrieben) noch für die Isolierung von Phytochrom aus etioliertem Roggen (D. Ernst, persönliche Mitteilung) erfolgreich eingesetzt werden konnte.

2. Isophytochrome

In den gereinigten Phytochrompräparationen gelang der erstmalige gesicherte Nachweis von zwei verschiedenen Phytochrom-Isoproteinen. Sie entsprechen den von Hershey et al. (1985) beschriebenen Genprodukten des AP 5-Gens sowie der AP 3- und AP 4-Gene.

Diese Heterogenität der Primärstruktur von Haferphytochrom

kann durchaus einige der sehr verschiedenen Eigenschaften von Phytochrom erklären (Pratt, 1982).

Ob diese Isophytochrome nun mit den von Takimoto und Saji (1984) geforderten stabilen und labilen Phytochromspezies in Einklang zu bringen sind, ist ebenso fraglich wie der Vergleich zu den von Jordan et al. (1984) geforderten multiplen Phytochromspezies in etioliertem Hafer, die auf Unterschiede in der Kreuzreaktivität von Phytochrom in löslichen- und Membranextrakten zurückgeführt wurden.

Die nachgewiesenen kern-codierten Isophytochrome, besitzen immerhin eine Homologie von 98%, wobei der Austausch der Aminosäuren unter den Genprodukten außerdem stark konservativ ist (Hershey et al., 1985).

Diese heterogenen Phytochromproteine unterscheiden sich zudem nicht signifikant in ihrer Löslichkeit, da sie gemeinsam in dem beschriebenen Isolierungsverfahren präpariert werden können.

Es konnten auch weder allgemeine noch unterschiedliche post-translationale Modifizierungen der Isophytochrome nachgewiesen werden (eigene Ergebnisse und R. Schendel, Dissertationsarbeit). So bleibt die Frage offen, ob diese Isophytochrome das Ergebnis einer unterschiedlichen Kompartimentierung in der pflanzlichen Zelle darstellen und ob sie für die große Vielfalt verschiedenster Phytochromreaktionen verantwortlich sind (Shropshire und Mohr, 1983).

In augenblicklicher Aufklärung befindet sich noch die Frage, ob die bei der IEF auftretenden multiplen Banden hochreiner Phytochromlösungen mit den verschiedenen Isophytochromen in Einklang zu bringen sind.

3. Rückschlüsse aus den Proteolyseversuchen

3.1. Lokalisierung des Proteinanteils für die vollständige Protein-Chromophor-Interaktion

Die proteolytische Degradation von nativem Phytochrom durch endogene Proteasen zum 118/114 kDa-Phytochrom geht mit einer spektralen Verschiebung des Absorptionsmaximums in der P_{fr} -Form von 730 nm nach 724 nm (Abb. 26) einher, während in der P_r -Form keine spektralen Veränderungen festzustellen sind (Vierstra und Quail, 1982).

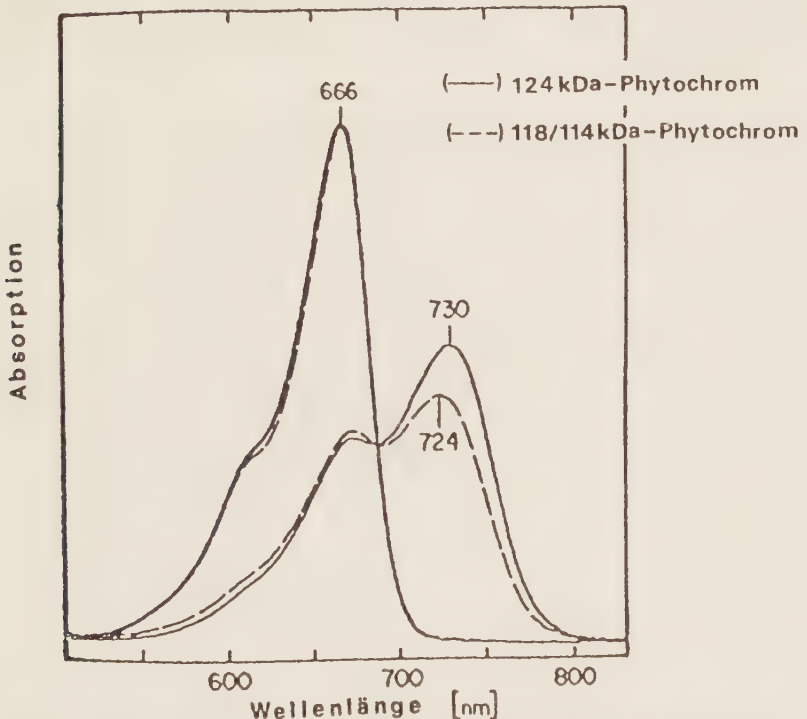


Abb. 26: Absorptionsspektren von nativem 124 kDa-Phytochrom und "Großem Phytochrom" mit 118/114 kDa.

Laut Literatur werden die 6- und 10 kDa großen Restpeptide,

die für die vollständige Protein-Chromophor-Interaktion, d.h. die Ausbildung des Maximums bei 730 nm in der P_{fr} -Form, verantwortlich sind, ausschließlich vom Aminoterminus des nativen Phytochroms abgespalten (Daniels und Quail, 1984), da natives 124 kDa-Phytochrom einen blockierten Aminoterminus besitzt (Quail, 1983) und für das 118/114 kDa-Phytochrom offene Aminotermini gefunden wurden (Hunt und Pratt, 1980). Nach der Publikation der aus der Basensequenz abgeleiteten Primärstruktur von Phytochrom aus etioliertem Hafer (Hershey et al., 1985) zeigte sich, daß die von Hunt und Pratt (1980) bestimmten Aminotermini für das 118/114 kDa-Phytochrom, dem sog. "Großen Phytochrom", nicht korrekt sein konnten. Die Sequenz A L V war in der gesamten Aminosäuresequenz nicht vorzufinden, während die Sequenz K A L, die von Aminosäure 142 - 144 reicht, ein Peptid mit einer maximalen Größe von 106 kDa ergab.

Bei den eigenen Proteolyseversuchen mit endogenen Proteasen, die ebenfalls Degradationsprodukte von 118, 116 und 114 kDa mit einer Spektralverschiebung des Absorptionsmaximums in der P_{fr} -Form von 730 nm nach 724 nm ergaben, konnte eine einheitliche aminoterminal Sequenz mit A-34 als Aminoterminus für die drei genannten Fragmente bestimmt werden.

Bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 110 Da pro Aminosäure entspricht die Schnittstelle zwischen N-33 und A-34 einer oder mehreren Peptidabspaltungen von insgesamt 3.6 kDa vom Aminoterminus. Dies bedeutet, daß auf dem proteolytischen Weg von 124 $\rightarrow$ 118 $\rightarrow$ 116 $\rightarrow$ 114 kDa jeweils 2.4, 4.4 und 6.4 kDa vom Carboxyterminus abgespalten werden müssen.

Dieses Ergebnis steht damit im Gegensatz zu den bisher publizierten Daten über den Aminoterminus der degradierten "Großen Form von Phytochrom" mit 118/114 kDa (Hunt und Pratt, 1980) und dessen Zuordnung in die Gesamtsequenz des nativen 124 kDa-Phytochroms (Daniels und Quail, 1984).

Die Fragmente mit einem Gesamt-molekulargewicht von 6 und 10 kDa, die bei der Degradation des nativen Phytochroms abge-

spalten werden und für die vollständige Protein-Chromophor-Interaktion beschrieben wurden, werden sowohl aus dem aminoterminalen als auch aus dem carboxyterminalen Bereich abgespalten.

Peptide mit einem intakten Aminoterminus, deren M_r größer als 74 kDa ist, weisen das unveränderte Spektrum des nativen 124 kDa-Phytochroms mit einem Absorptionsmaximum in der P_{fr} -Form bei 730 nm auf (Jones et al., 1985, eigene Untersuchungen). Daraus kann gefolgert werden, daß der Teil des Proteins, der für die vollständige Protein-Chromophor-Interaktion verantwortlich ist, in den ersten 33 Aminosäuren der Gesamtsequenz lokalisiert ist.

3.2. Lokalisierung des Proteinanteils für die Ausbildung des Absorptionsmaximums bei 722 nm in der P_{fr} -Form

Während die tryptischen 113 kDa- und 59 kDa-Chromopeptide, die spektral dem "Großen und Kleinen Phytochrom" entsprechen, neben einem normalen P_r -Absorptionsspektrum ein charakteristisches P_{fr} -Absorptionsspektrum aufweisen (Abb. 27), zeigt das tryptische 39 kDa-Chromopeptid neben der typischen P_r -Absorption keine P_{fr} -Absorption bei $\lambda = 720 - 724$ nm mehr an (Abb. 27). Stattdessen erscheint eine breite Bande mit geringerer Absorption und einem hypsochromen Shift im Absorptionsmaximum nach $\lambda = 654$ nm (Reiff et al., 1985). Man spricht von einem gebleichten Phytochrom, das aber noch vollständig photoreversibel ist.

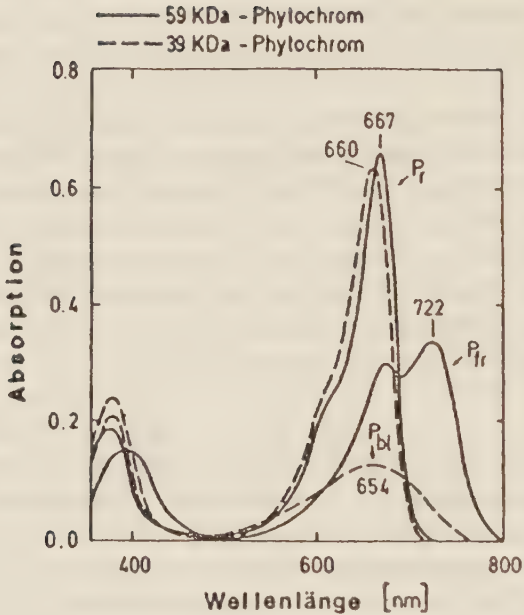


Abb. 27: Absorptionsspektren vom 59 kDa- und 39 kDa-Phytochrom

Der Teil der Proteinkette, der für die Ausbildung des langwelligeren Maximums in der P_{fr} -Form verantwortlich ist, muß im 59 kDa-Peptid also noch vorhanden sein und dementsprechend im 39 kDa-Peptid fehlen.

Aus der Zuordnung der Fragmente in die Gesamtsequenz (Kapitel III, 3.2., Abb. 13) geht hervor, daß beide Fragmente mit V-66 beginnen. Der Teil des Proteins, der die P_{fr} -Form stabilisiert und im 59 kDa-Peptid noch vorhanden sein muß, während er im 39 kDa-Peptid fehlt, ist im Bereich von E-427 bis K-595 lokalisiert.

3.3. Lokalisierung des Proteinanteils für die Stabilisierung der Pr-Form

Das tryptische 39 kDa-Fragment weist noch eine vollständige Photoreversibilität zwischen der Pr-Form und der anstelle der Pr-Form auftretenden gebleichten Form auf (Reiff et al., 1985).

Diese Eigenschaft liegt im tryptischen 23.5 kDa-Chromopeptid jedoch nicht mehr vor (Kapitel III, 3.2.5.1.). Die Pr-Form, die durch ihren niedrigen ϵ -Wert bereits gebleichte Eigenschaften zeigt, bleicht nach Belichtung irreversibel aus und gleicht in seinen Spektraleigenschaften kleinen Chromopeptiden mit nur noch 8 - 11 Aminosäureresten (Thümmler und Rüdiger, 1983). Dies bedeutet, daß der Proteinanteil, der sowohl für die Stabilisierung der Pr-Form, als auch für die Photoreversibilität zwischen der Pr-Form und der gebleichten Form verantwortlich ist, im 39 kDa-Peptid noch vorliegt und im 23.5 kDa-Chromopeptid fehlt.

Aus der Zuordnung der Fragmente in die Gesamtsequenz des nativen Moleküls (Kapitel III, 3.2., Abb. 13) geht hervor, daß der Proteinanteil zwischen V-66 und K-209 die Stabilisierung der Pr-Form bewirken müßte.

Auf der Yamada Konferenz 1986 in Japan beschrieben A. Jones und P. Quail aus dem Abbau von nativem 124 kDa-Phytochrom mit Subtilisin ein 16 kDa-Chromopeptid mit den gleichen Spektraleigenschaften wie das tryptische 39 kDa-Chromopeptid. P. Quail postulierte als aminoterminaler Schnittstelle P-191 und grenzte den Proteinanteil, der zur Stabilisierung der Chromophorkonfiguration in der Pr-Form nötig ist, auf das Proteinsegment zwischen P-191 und K-209 ein (P. Quail, ESOPP 1987, Spetses).

Die Identifizierung der Spektraleigenschaften des 16 kDa-Chromopeptids wurde allerdings nicht mit gereinigten Präparationen, sondern mit dem gesamten Proteolyseansatz durchgeführt.

Nachdem das 16 kDa-Chromopeptid mit den beschriebenen Spek-

traleigenschaften im Inkubationsansatz durch Subtilisinproteolyse reproduziert werden konnte, wurde nach Auftrennung des Proteolyseansatzes über PAGE und Elektrobplot auf aktivierte Gf der Aminoterminus des Fragments bestimmt.

Überraschenderweise lautete die Sequenz S L P G mit S-212 als aminoterminaler Aminosäure. Somit liegt die Sequenz des 16 kDa-Chromopeptids aus dem Subtilisinabbau innerhalb der Sequenz des tryptischen 23.5 kDa-Chromopeptids, das aber in der P_r-Form nicht mehr die volle Absorption des nativen Phytochroms besitzt und das nicht mehr photoreversibel ist.

Daraus ergibt sich, daß die Spektraleigenschaften des 16 kDa-Chromopeptids aus dem Subtilisinabbau auf Aggregationsphänomene des Chromopeptids mit anderen Subtilisinfragmenten zurückzuführen sind, die die Chromophorkonfiguration der P_r-Form stabilisieren.

4. Charakterisierung der Schnittstellen

Betrachtet man die charakteristischen Schnittstellen der bei den Fragmentierungsversuchen verwendeten Proteasen Trypsin, Endoproteinase Lys-C, Endoproteinase Glu-C, Subtilisin und der endogenen Proteasen im Hydropathy-Plot des nativen 124 kDa-Phytochroms (III.3.6., Abb. 21), so fällt auf, daß sich die Schnittstellen nicht nur in hydrophilen und neutralen Regionen, sondern auch in hydrophoben Regionen befinden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den von Hershey et al. (1985) vorhergesagten Schnittstellen nach R-53, K-91 und K-648, die sich ausschließlich in hydrophilen oder neutralen Segmenten befinden. Während die Schnittstelle hinter R-53 noch gefunden wird, befinden sich K-91 und K-648 in sehr stabilen Fragmenten und werden auch nach längerer Inkubationszeit nicht angegriffen.

Auf die C-terminale Schnittstelle des aminoterminal blockierten 40 kDa-Fragments (zwischen E-343 und E-354), das spezifisch bei der Proteolyse der P_{rr}-Form mit Endoproteina-

se Glu-C gebildet wird, sei besonders hingewiesen. Sie befindet sich innerhalb einer sog. PEST-Sequenz (Rogers et al., 1987), die direkt an die chromophorthragende Aminosäure C-322 anschließt und von H-323 bis K-361 reicht.

Diese P_{tr} -spezifische Schnittstelle ist in einer Region lokalisiert, die reich an Glutaminsäure-Resten ist und von positiv geladenen Aminosäureresten flankiert ist.

Damit erfüllt dieser Teil des Phytochromproteins ein wesentliches Merkmal vergleichbarer Proteinsequenzen, die ein hohes Maß an P, E, (D), S oder T besitzen und bekanntermaßen proteolytisch schnell gespalten werden. Für das Phytochromprotein in der P_{tr} -Form ist eine Halbwertszeit von 1 Stunde beschrieben (Pratt, 1982).

Dieses Ergebnis läßt die Vermutung zu, daß am raschen, spezifischen turn-over der P_{tr} -Form von Phytochrom möglicherweise nicht nur das Ubiquitinsystem beteiligt ist (Shanklin et al., 1987), sondern auch sequenzspezifische endogene Proteasen. Von bemerkenswerter Auffälligkeit sind auch die in der Primärstruktur von Phytochrom enthaltenen 7 Positionen mit zwei aufeinanderfolgenden basischen Resten. Solche Stellen sind im allgemeinen bevorzugte Angriffspunkte von Proteasen.

Bei Säugetieren konnte gezeigt werden, daß durch die proteolytische Spaltung zwischen den beiden basischen Aminosäuren aus einem Precursormolekül verschiedene Peptidhormone freigesetzt werden. So entstehen beispielsweise aus dem Protein Pro-Opiomelanocortin aus Rind durch mehrfache proteolytische Spaltung zwischen zwei basischen Resten mehrere unterschiedliche Hormone wie Corticotropin, Melanocyten stimulierendes Hormon, Beta-Endorphin und Enkephalin (Bloom, 1981). Ein derartiges Peptidhormonsystem ist bei Pflanzen allerdings bisher noch unbekannt.

Dennoch verdient der Umstand Beachtung, daß 6 von 7 der doppelbasischen Positionen im Phytochrommolekül relativ stark exponiert sind (R/R-547/8, K/R-595/6, K/R-703/4, R/K-857/8, K/R-895/6 und R/K-918/9, siehe folgendes Kapitel, Abb. 28).

K/R-595/6 stellt auch eine nachgewiesene, bevorzugte Schnittstelle von Trypsin dar, ebenso wie K/R-703/4 von Endoproteinase Lys-C (III.3.2. und 3.3.). Betrachtet man die enorme Vielfalt phytochromvermittelter Reaktionen (Shropshire und Mohr, 1983), so stellt die Möglichkeit, daß Phytochrom als Precursorprotein gebildet wird und durch gezielte Proteolyse in vivo in verschiedene Fragmente mit unterschiedlicher physiologischer Aktivität gespalten werden kann, einen interessanten Aspekt zur partiellen Erklärung dieser Wirkungsvielfalt von Phytochrom dar.

5. Charakterisierung der Tertiärstruktur von Phytochrom

Seit den ersten erfolgreichen Isolierungsversuchen von nativem 124 kDa-Phytochrom (Vierstra und Quail, 1983, Litts et al., 1983) aus etioliertem Hafer wurde intensiv versucht, die Struktur des Proteins, insbesondere die Unterschiede auf der Proteinoberfläche zwischen der inaktiven P_r -Form und der physiologisch aktiven P_{fr} -Form, aufzuklären. Diese Fragestellung wurde bisher auf verschiedenen Wegen in Angriff genommen.

So konnten monoklonale Antikörper gewonnen werden, die zwischen P_r und P_{fr} diskriminieren, wobei sie mit der P_r -Form besser reagieren als mit der P_{fr} -Form (Thomas et al., 1984, Cordonnier et al., 1985, Holdsworth M., ESOPP 1987, Spetses, Plumpton Ch., ESOPP 1987, Spetses). Cordonnier et al. (1985) beschrieben als Epitop für die drei P_r -spezifischen m-AK Oat-23, Oat-24 und Oat-25 das 6 kDa-Peptid, das bei der Proteolyse vom 124 kDa zum 118 kDa-Phytochrom durch endogene Proteasen abgespalten wird und ausschließlich dem Aminoterminus des nativen 124 kDa-Phytochroms zugeordnet wurde. Dieses aminoterminale 6 kDa-Segment sollte daher in der Tertiärstruktur der P_r -Form stärker exponiert sein als in der P_{fr} -Form.

Die gleiche Schlußfolgerung wurde auch aus limitierten Pro-

teolyseversuchen von nativem 124 kDa-Phytochrom gezogen, die mit endogenen Proteasen (Jones et al., 1985) und mit den Endoproteasen Subtilisin, Thermolysin, Trypsin und Clostripain durchgeführt wurden (Lagarias und Mercurio, 1985).

Die Größe des N-terminalen Fragments, das in der P_r - und P_{rr} -Form unterschiedlich exponiert ist, wurde mit 10 kDa (Jones et al., 1985) und mit 4 - 10 kDa (Lagarias und Mercurio, 1985) beschrieben. Es wurde weiterhin gefunden, daß CD-Spektralunterschiede zwischen der P_r - und P_{rr} -Form, die auf das aminoterminalen 6 - 10 kDa-Peptid zurückgeführt wurden (Vierstra et al., 1987), durch monoklonale Antikörper aufgehoben werden können, die in dieser Domäne binden (Chai et al., 1987).

Weitere exponierte Regionen sind durch zusätzliche proteolytische Sensitivität der P_{rr} -Form am Carboxyterminus von Peptiden mit 84 kDa und 100 kDa, vom Aminoterminus ausgehend, beschrieben (Lagarias und Mercurio, 1985).

Es wurden auch verschiedene Domänen für das native Phytochromprotein vorgeschlagen. Man unterschied zwischen einer sehr kompakten aminoterminalen Hälfte, die den Chromophor enthält und etwa 69 - 72 kDa (Lagarias und Mercurio, 1985) oder 74 kDa (Jones et al., 1985) umfaßt und einer C-terminalen Hälfte von 52 - 55 kDa, die wesentlich stärker proteolytisch angreifbar ist (Lagarias und Mercurio, 1985) und die Kontaktstelle der Dimerisation enthält (Jones und Quail, 1986).

Die Möglichkeit der Mikrosequenzierung proteolytischer Fragmente von Phytochrom erlaubte mir nun die erstmalige exakte Lokalisierung von Fragmenten in der gesamten Aminosäuresequenz vom 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer und eine exakte Beschreibung bevorzugter Schnittstellen für verschiedene Endoproteinasen. Aus diesen Ergebnissen lassen sich auch allgemeine Rückschlüsse auf die Konformation des nativen Proteins ziehen.

Die gesamte Lokalisierung von proteolytischen Fragmenten, die entweder nur beim Abbau der P_r -Form oder ausschließlich

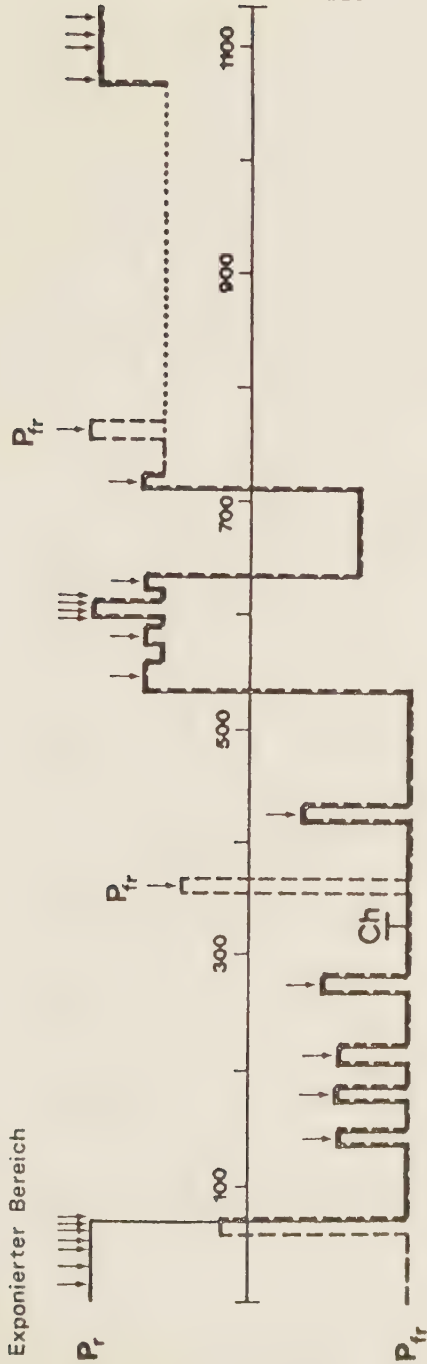
der P_{17} -Form gebildet wurden, ermöglicht auch eine relativ genaue Beschreibung der Proteinsegmente, die bei der Photo-konversion von P_r zu P_{17} oder umgekehrt die Konformationsänderung im Protein durchführen.

Vorab kann festgestellt werden, daß die aminoterminalen Sequenzen, die von mehr als 25 proteolytischen Fragmenten über den vollautomatischen Edman-Abbau bestimmt wurden, keine Unstimmigkeiten mit der von Hershey et al. (1985) beschriebenen Proteinsequenz aufwiesen, die aus der Basensequenz von cDNA und genomischer DNA abgeleitet wurde.

Es ist bemerkenswert, daß trotz der Vielzahl potentieller Spaltungsmöglichkeiten in der gesamten Polypeptidkette von den eingesetzten spezifischen Endoproteinasen (Trypsin: K, R, Endoproteinase Lys-C: K, Endoproteinase Glu-C: E) unmittelbar nur relativ wenige Schnittstellen attackiert werden, während andere Schnittstellen über eine längere Inkubationszeit hinweg stabil sind. Dies bedeutet, daß gewisse Bereiche der Peptidkette, die von primären proteolytischen Angriffen betroffen sind, auf der Proteinoberfläche exponiert sein müssen bzw. nach beginnender partieller Proteolyse zugänglich gemacht werden. Potentielle Schnittstellen, die auch noch nach längerer Inkubation in den Fragmenten nicht attackiert werden, müssen daher eher dem inneren Teil der nativen Proteinkonformation zugewandt sein.

Der Vergleich aller Proteolyseversuche mit den Proteasen unterschiedlicher Spaltungsspezifität ergab für alle Proteasen die gleichen exponierten und geschützten Regionen im Phytochrom. Daraus lassen sich folgende Rückschlüsse auf die Tertiärstruktur von nativem Phytochrom ziehen, die in Abb. 28 graphisch dargestellt sind.

In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Cordonnier et al., 1985, Jones et al., 1985, Lagarias und Mercurio, 1985) wurde die N-terminale Domäne gefunden, die in der P_r -Form exponiert ist und in der P_{17} -Form nicht zugänglich ist. Im Gegensatz dazu wurde aber nicht die Abspaltung eines einzigen N-terminalen Fragments in der P_r -Form gefunden, son-



Innerer Bereich

Abb. 28: Schematische Darstellung von exponierten und innengelegenen Teilen der Peptidkette von 124 kDa-Phytochrom. Aus der Lokalisation bevorzugter Schnittstellen der verschiedenen Proteasen wurden die exponierten Regionen abgeleitet. Regionen, die auch noch nach längerer Inkubationszeit nicht angegriffen wurden, sind dem inneren Teil des Proteins zugeordnet. Der Grad der Exposition oder der Protektion ist aufgrund der Anzahl und der Menge der Fragmente geschätzt, die innerhalb der einzelnen Schnittstellen gebildet werden.

(—) P_r -Form (---) P_{fr} -Form

(.....) Bereiche ohne Schnittstellen

Vertikale Pfeile (↑) zeigen die lokalisierten Proteolyse-Schnittstellen

Ch = Chromophor

dern es konnten innerhalb der ersten 60 Aminosäuren vom Amino-terminus, mehrere P_r-spezifische Schnittstellen detektiert werden (R-21, N-33, K-47, E-50 und R-53).

Die Region um die Reste R-62, S-63, E-64, K-65 und Y-69 muß in beiden Phytochromformen P_r und P_r⁺ sehr stark exponiert sein, da diese Reste als bevorzugte, frühe Schnittstellen in beiden Formen gefunden wurden. Daraus ergibt sich aber eine P_r-spezifische Abspaltung von insgesamt 6.6 kDa vom Amino-terminus. Eine weitere Ausweitung der P_r-spezifischen proteolytischen Sensitivität auf 10 kDa, wie bisher häufig in der Literatur beschrieben (Vierstra und Quail, 1983, Daniels et al., 1984, Jones et al., 1985, Lagarias und Mercurio, 1985), konnte daher nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits von Lagarias und Mercurio (1985) postuliert, besitzt die C-terminale Hälfte von Phytochrom multiple proteolytische Schnittstellen. Daraus kann geschlossen werden, daß diese Region in der nativen Konformation exponiert ist oder nach ersten proteolytischen Spaltungen leicht zugänglich wird.

Eine labile Schnittstelle der Endoproteinase Lys-C konnte nach K-698 oder K-703 lokalisiert werden. Das daraus resultierende Fragment wird nach K-595 rasch weitergespalten. Bei der Trypsinproteolyse konnte dann auch ein kleines Fragment mit 8.8 kDa identifiziert werden, das von L-625 bis K-703 oder R-704 reicht und das auch nach langer Inkubationszeit noch sehr stabil ist, obwohl es weitere 4 R- und 4 K-Reste enthält.

Die Region um die Aminosäure K-595 ist in beiden Phytochromformen sehr stark exponiert. So konnten bevorzugte proteolytische Schnittstellen nicht nur hinter K-595 von Endoproteinase Lys-C gefunden werden, sondern auch hinter K-595, R-596 von Trypsin, hinter E-597 von Endoproteinase Glu-C und nach A-598 / L-600 von Subtilisin.

Diese nebeneinanderliegenden Spaltstellen der verschiedenen

Proteasen ergeben mit den Schnittstellen hinter E-64 (Endoproteinase Glu-C), K-65 (Trypsin, Endoproteinase Lys-C) oder Y-69 (Subtilisin) ein 58 - 59 kDa-Fragment, das seit langer Zeit als sog. "Kleines Phytochrom" bekannt ist.

Die weitere Fragmentierung dieses 58 - 59 kDa-Fragments wurde vor allem mit Trypsin untersucht. Es wurden folgende Fragmente in der P_r -Form und in der P_{rr} -Form mit V-66 als N-terminale Aminosäure gefunden: 55 kDa (bis K-565), 52 kDa (bis K-537), 39 kDa (bis R-426), 23.5 kDa (bis R-278) und 13 kDa (bis K-185).

Zudem wurden 2 weitere Schnittstellen nach K-142 für ein 31 kDa-Fragment (bis R-426) und nach K-209 für ein 23.5 kDa-Fragment (bis R-426) gefunden.

Diese Schnittstellen sind in Abb. 28 in ihrer Höhe entsprechend ihrer Häufigkeit in den verschiedenen Fragmenten und der Qualität der Fragmente eingezeichnet. Viele dieser Schnittstellen scheinen erst nach Bildung dieses 58 - 59 kDa-Fragments exponiert zu werden.

Von allen untersuchten proteolytischen Fragmenten seien besonders 2 Fragmente von 83 und 40 kDa erwähnt, die ausschließlich beim Abbau der P_{rr} -Form erhalten werden und einen blockierten Aminoterminalus besitzen. Als wahrscheinlichste C-terminale Aminosäuren wurden K-753 für das 83 kDa-Fragment und E-354 für das 40 kDa-Fragment postuliert. Diese Aminosäuren müssen sich demnach in Regionen der Peptidkette befinden, die nur in der P_{rr} -Form exponiert sind, nicht aber in der P_r -Form.

Die P_{rr} -spezifische Schnittstelle nach K-753, die beim Abbau mit Trypsin und Endoproteinase Lys-C gefunden wurde, befindet sich in einer kleinen hydrophoben Tasche (751 - 769, Abb. 21). Eine genauere Beschreibung der Größe und Ausdehnung der Region um K-753 kann aber nicht vorgenommen werden. Sie korreliert dennoch wohl ebenso mit der von Lagarias und Mercurio (1985) beschriebenen Schnittstelle am C-Terminus eines 84 kDa-Peptids in der C-terminalen Hälfte des Proteins, als auch mit der von Wong et al. (1986) beschriebenen

P_{II} -spezifischen Phosphorylierungsseite zwischen 69 - 84 kDa vom Aminoterminus ausgehend.

Die Region um Aminosäure E-354, die ebenfalls nur in der P_{II} -Form exponiert ist, war bisher in der Literatur noch nicht als eine unterschiedlich exponierte Stelle in den Proteinkonformationen von P_I und P_{II} beschrieben.

Hershey et al. (1985) beschrieben zwar allgemein aufgrund von theoretischen Analysen nach Hopp und Woods (1983), daß der Bereich zwischen den Aminosäuren 343 und 365 eine antigene Determinante darstellen müßte und daher auf der Proteinoberfläche exponiert sein sollte. Es wurde aber zum einen nicht zwischen P_I und P_{II} unterschieden und zum anderen fehlten bisher jegliche experimentelle Ergebnisse.

Diese P_{II} -spezifische Schnittstelle in der Region um E-354 ist bemerkenswert nahe an der Aminosäure C-322 gelegen, die den kovalent gebundenen Tetrapyrrol-Chromophor trägt. So erscheint es als durchaus wahrscheinlich, daß während der $P_I \rightarrow P_{II}$ -Transformation mit der Konformationsänderung dieses Teils der Polypeptidkette hin zur Proteinoberfläche eine entsprechende Bewegung des Chromophors einhergeht. Eine Bewegung des Chromophors innerhalb des Proteins ist zudem bereits dokumentiert (Sundqvist und Björn, 1983, Ekelund et al., 1985).

Da der Chromophor in der P_{II} -Form auch etwas reaktiver gegenüber chemischen Reagenzien als in der P_I -Form ist (Hahn et al., 1984, Thümmel et al., 1985), besteht außerdem die Möglichkeit, daß sich während der $P_I \rightarrow P_{II}$ Phototransformation der Chromophor zusammen mit der Region um E-354 der Peptidkette zur Proteinoberfläche hinbewegt.

6. Zur Lokalisierung von Epitopen monoklonaler Antikörper

Die exakte Lokalisierung proteolytischer Fragmente in der Gesamtsequenz des nativen 124 kDa-Phytochroms ermöglichte es auch, Epitope verschiedener monoklonaler Antikörper zu lokalisieren. Nach Auftrennung der proteolytischen Fragmente über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot zeigte die positive Reaktion eines Antikörpers das Epitop innerhalb eines bestimmten Fragments an. So konnten insgesamt 7 verschiedene Regionen als Bindungsstellen monoklonaler Antikörper bisher identifiziert werden (Kapitel III.4.). Einige Epitope konnten bis auf 18 Aminosäuren eingegrenzt werden.

Damit gelang eine wesentlich genauere Charakterisierung von Epitopen monoklonaler Antiphytochrom-Antikörper als bisher in der Literatur beschrieben wurde (Daniels und Quail, 1984, Cordonnier et al., 1985, Jones et al., 1985, Silberman et al., 1985). Doch scheint auch diese Methode bereits von einer noch besseren und genaueren Methode abgelöst zu werden. So beschrieb M. M. Cordonnier auf dem ESOPP 1987, Spetses, daß sie mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie das Epitop des m-Ak Pea-25 auf 6 Aminosäuren in der Gesamtsequenz von Haferphytochrom begrenzen konnte (IFGADE, 766 - 772). Die exakte Lokalisierung weiterer Epitope über diese Technologie ist nur noch eine Frage der Zeit.

Literaturverzeichnis

Aebershold, R.M., Teplow, D.B., Hood, L.E. und Kent, S.B.M. (1986):

Electroblotting onto activated glass: High efficiency preparation of proteins from analytical SDS-Polyacrylamid gels for direct sequence analysis.

J. Biol. Chem. 261, 4229 - 4238

Ansorge, W. (1982):

Fast vizualisation of protein bands by inpregnation in potassium permanganate and silver nitrate.

Elektrophoresis '82, de Gruyter Berlin 1982, 235 - 242

Berkelman, T.R., Lagarias, J.C. (1986):

Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamid gels.

Anal. Biochem. 156, 194 - 201

Bloom, F.E. (1981):

Neuropeptide - Botenstoffe in Gehirn und Körper
Spektrum der Wissenschaft, 12 / 1981, 72 - 83

Bolton, G.W., Quail, P.H. (1982):

Cell-free synthesis of phytochrome apoprotein.
Plant 155, 212 - 217

Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W. (1952):

The reaction controlling floral initiation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 929 - 934

Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, M.W. und Hendricks, S.B. (1959):

Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 1703 - 1708

- Cha, T.A., Maki, A.M., Lagarias, J.C. (1983):
Low - temperature luminescence characterization of
124 kDa-phytochrome from Avena sativa.
Biochemistry **22**, 2846 - 2851
- Chai, Y.G., Singh, B.R., Song, P.-S., Lee, J., Robinson,
G.W. (1987):
Purification and spectroscopic properties of 124 kDa-
phytochrome.
Anal. Biochem. **163**, 322 - 330
- Chai, Y.G., Song, P.-S., Cordonnier, M.-M., Pratt, L.H.
(1987):
A photoreversible circular dichroism spectral change
in oat phytochrome is suppressed by a monoclonal an-
tibody that binds near its N-terminus and by chromo-
phore modification.
Biochemistry **26**, 4947 - 4952
- Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1978):
Empirical predictions of protein conformation.
Ann. Rev. Biochem. **47**, 251 - 276.
- Colbert, J.T., Hershey, H.P., Quail, P.H. (1983):
Autoregulatory control of translatable phytochrome
mRNA levels.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA **80**, 2248 - 2252
- Cordonnier, M.M., Pratt, L.H. (1982):
Immunopurification and initial characterization of
dicotyledonous phytochrome.
Plant Physiol. **69**, 360 - 365
- Cordonnier, M.M., Greppin, H. and Pratt, L.H. (1985):
Monoclonal antibodies with differing affinities to
the red-absorbing and far-red-absorbing forms of phy-
tochrome.
Biochemistry **24**, 3246 - 3253

- Cordonnier, M.M., Greppin, H. and Pratt, L.H. (1986):
Identification of a highly conserved domain on phytochrome from angiosperms to algae.
Plant Physiol. 80, 982 - 987
- Daniels, S.M., Quail, P.H. (1984):
Monoclonal antibodies to three separate domains on 124 kDa phytochrome from Avena.
Plant Physiol. 76, 622 - 626.
- Datta, N., Roux, S.J. (1985):
A rapid procedure for the purification of 124 kDa phytochrome from Avena.
Photochem. Photobiol. 41, 229 - 232
- Eckerskorn, Ch., Mewes, W., Goretzki, H., Lottspeich, F. (1987):
A new siliconized glass fiber as support for protein-chemical analysis of electroblotted proteins
Eur. J. Biochem., eingereicht
- Ekelund, N.G.A., Sundqvist, Ch., Quail, P.H., Vierstra, R.D. (1985):
Chromophore rotation in 124 kDa Avena sativa phytochrome as masured by light-induced changes in linear dichroism.
Photochem. Photobiol. 41, 221 - 223
- Fry, K.T., Mumford, F.E. (1971):
Isolation and partial characterization of a chromophore-peptide fragment from pepsin digests of phytochrome.
Biochem. and Biophys. Res. Communications 45, 1466 - 1473
- Gardner, G., Pike, C., Rice, H.V., Briggs, W.R. (1971):
"Disaggregation" of phytochrome in vitro: A consequence of proteolysis.
Plant Physiol. 48, 686 - 693
- Gershoni, J.M., Palade, G.E. (1983):
Protein blotting: principles and applications.
Anal. Biochem. 131, 1 - 15

- Gottmann, K., Schäfer, E. (1982):
In vitro synthesis of phytochrome apoprotein directed
by mRNA from light and dark grown *Avena* seedlings.
Photochem. Photobiol. **35**, 521 - 525
- Grombein, S., Rüdiger, W. (1975):
Phytochrome pelletability in extracts on *avena*
shoots.
Plant Science Letters **5**, 275 - 280
- Hahn, T.R., Song, P.S., Quail, P.H. and Vierstra, R.D.
(1984):
Tetranitromethane oxidation of phytochrome chromophore
as a function of spectral form and molecular
weight.
Plant Physiol. **74**, 75 - 758
- Hershey, H.P., Colbert, J.C., Lissemore, J.L., Barker, R.F.,
Quail, P.H. (1984):
Molecular cloning of cDNA for *Avena* phytochrome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2332 - 2336
- Hershey, H.P., Barker, R.F., Idler, K.B., Lissemore, J.L.,
Quail, H.P. (1985):
Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for
phytochrome: Complete amino acid sequence for two
gene products expressed in etiolated *Avena*.
Nucleic Acid Res. **13**, 8543 - 8560
- Higgins, R.C., Dahmus, M.E. (1979):
Rapid visualization of protein bands in preparative
SDS-polyacrylamid gels.
Anal. Biochem. **93**, 257 - 260
- Hopp, T.P., Woods, K.R. (1983):
Prediction of protein antigenic determinants from
amino acid sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3824 - 3828

- Hunt, R.E., Pratt, L.H. (1979):
Phytochrome immunoaffinity purification.
Plant Physiol. 64, 332 - 336
- Hunt, R.E., Pratt, L.H. (1980):
Partial characterization of undegraded oat phytochrome.
Biochemistry 19, 390 - 394
- Jones, A.M., Vierstra, R.D., Daniels, S.M. and Quail, P.H. (1985):
The role of separate molecular domains in the structure of phytochrome from Avena sativa.
Planta 164, 501 - 506
- Jones, A.M., Quail, P.H. (1986):
Quaternary structure of 124 kDa phytochrome from Avena.
Biochemistry 25, 2987 - 2995
- Jordan, B.R., Partis, M.D., Thomas, B. (1984):
A study of phytochrome-membrane association using an enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting.
Physiol. Plant. 60, 416 - 421
- Kerscher, L., Nowitzki, S. (1982):
Western blot analysis of a lytic process in vitro specific for the red light absorbing form of phytochrome.
FEBS Lett. 146, 173 - 176
- Kerscher, L. (1983):
Subunit size, absorption spectra and dark reversion kinetics of rye phytochrome purified in the far-red absorbing form.
Plant Sci. Lett. 32, 133 - 138
- Laemmli, U.K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680 - 685

Lagarias, J.C., Rapoport, H. (1980):

Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the P_r-form of the phytochrome chromophore.

J. Amer. Chem. Soc. **102**, 4821 - 4828

Lagarias, J.C., Mercurio, F.M. (1985):

Structure function studies on phytochrome. Identification of light-induced conformational changes in 124 kDa Avena phytochrome in vitro.

J. Biol. Chem. **260**, 2415 - 2423

Lagarias, J.C. (1985):

Progress in the molecular analysis of phytochrome.

Photochem. Photobiol. **42**, 811 - 820.

Lagarias, J.C., Kelly, J.M., Cyr, K.L., Smith, W.O. (1987):

Comparative photochemical analysis of highly purified 124 kDa oat and rye phytochrome in vitro.

Photochem. Photobiol. **46**, 5 - 13

Lamb, C.J., Lawton, M.A. (1983):

Photocontrol of gene expression.

In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series 16 A, Shropshire, Jr., W. and Mohr, H. eds., pp. 213 - 257, Springer-Verlag, Berlin.

Litts, J.C., Kelly, J.M., Lagarias, J.C. (1983):

Structure-function studies in phytochrome: preliminary characterization of highly purified phytochrome from Avena sativa enriched in the 124 kDa species.

J. Biol. Chem. **258**, 11025 - 11031

LKB Instrument GmbH (1984):

Elektrophoretische Trennverfahren in ultradünnen Gelen.

Lottspeich, F. (1985):

Microscale isocratic separation of phenylthiohydantain amino acid derivatives.

J. Chromatogr. **326**, 321 - 327

- Mohr, H., Schopfer, P. (1978):
Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 3. Auflage, S. 311
f., Springer, Berlin-Heidelberg-New York
- Mumford, F.E., Jenner, E.L. (1966):
Purification and characterization of phytochrome from
oat seedlings.
Biochemistry 5, 3657 - 3662
- Pherson, A. (1982):
Preparation and analysis of protein crystals.
Handbuch, Wiley, New York
- Pike, C.S., Briggs, W.R. (1972):
Partial purification and characterization of a phy-
tochrome-degrading neutral protease from etiolated
oat shoots.
Plant Physiol. 49, 521 - 530
- Pratt, L.H. (1978):
Molecular properties of phytochrome.
Photochem. Photobiol. 27, 81 - 105
- Pratt, L.H. (1982):
The protein moiety.
Rev. Plant Physiol. 33, 557 - 582
- Quail, P.H., Schäfer, E., Marme, D. (1973):
Turnover of phytochrome in pumpkin cotyledons.
Plant Physiol. 52, 128 - 131
- Quail, P.H., Colbert, J.T., Hershey H.P., Vierstra, R.D.
(1983):
Phytochrome: Molecular properties and biogenesis.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 303, 387 - 402
- Reiff, U., Eilfeld, P., Rüdiger, W. (1985):
A photoreversible 39 kDa-fragment from the P₁-form
of 124 kDa oat phytochrome.
Z. Naturforsch. 40 c, 693 - 698

- Rice, H.V., Briggs, W.R., Jackson-White, C.J. (1973):
Purification of oat and rye phytochrome.
Plant Physiol. 51, 917 - 926.
- Rice, H.V., Briggs, W.R. (1973):
Partial characterization of oat and rye phytochrome.
Plant Physiol. 51, 927 - 938
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. (1987):
Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis.
Science 234, 364 - 368
- Rüdiger, W. (1980):
Phytochrome, a light receptor of plant photomorphogenesis.
Struct. Bonding 40, 101 - 140.
- Rüdiger, W., Brandlmeier, T., Blos, I., Gossauer, A., Weller, J.P. (1980):
Isolation of the phytochrome chromophore. The cleavage reaction with hydrogen bromide.
Z. Naturforsch. 35 c, 763 - 769
- Rüdiger, W., Thümmel, F., Cmiel, E. and Schneider, S. (1983):
Chromophore structure of the physiologically active form (P_r) of Phytochrome.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 6244 - 6248
- Rüdiger, W. (1983):
Chemistry of the phytochrome photoconversions.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 303, 377 - 386
- Schopfer, P. (1977):
Phytochrome control of enzymes.
Ann. Rev. Plant Phys. 28, 223 - 252
- Schwarz, H. (1986):
Dissertation

Schwarz, H., Schneider, H.A.W. (1987):

Immunological assay of phytochrome in small sections of roots and other organs of maize (*Zea mays* L.) seedlings.

Planta 170, 152 - 160

Shanklin, J., Jabben, M., Vierstra, R.D. (1987):

Red light-induced formation of ubiquitin-phytochrome conjugates: Identification of possible intermediates of phytochrome degradation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 359 - 363

Sharrock, R.A., Lissemore, J.L., Quail, P.H. (1986):

Nucleotide and amino acid sequence of a Cucurbita phytochrome cDNA clone: Identification of conserved features by comparison with Avena phytochrome.

Gene 47, 287 - 295

Shimazaki, Y., Pratt, L.H. (1985):

Immunochemical detection with rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies of different pools of phytochrome from etiolated and green Avena shoots.

Planta 164, 321 - 322

Siegelman, M.W., Wiczorek, G.A., Turner, B.L. (1965):

Preparation of calcium phosphate for protein chromatography.

Anal. Biochem. 13, 402 - 404

Silberman, L.G., Datta, N., Hoops, P., Roux, S.J. (1985):

Characterization of monoclonal antibodies to oat phytochrome by competitive radioimmunoassays and comparative immunoblots of phytochrome peptides.

Archives of Biochemistry and Biophysics 236, 150 - 158

Silverthorne, J., Tobin, E.M. (1984):

Demonstration of transcriptional regulation of specific genes by phytochrome action.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1112 - 1116

Smith, H. (1975):

Phytochrome and photomorphogenesis.

Mc Graw - Hill, London

- Smith, W.O., Daniels, S.M. (1981):
Purification of phytochrome by affinity chromatography on agarose-immobilized Cibacron blue 3GA.
Plant Physiol. **68**, 443 - 446
- Smith, W.O. (1983):
Phytochrome as a molecule.
In: Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, **16 A**,
Photomorphogenesis, Shropshire, Jr., W. and Mohr, H.
eds., pp. 96 - 118, Springer-Verlag, Berlin.
- Swank, R.T., Munkres, K.D. (1971):
Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamid gels with SDS.
Anal. Biochem. **39**, 462 - 477
- Takimato, A., Saji (1984):
A role of phytochrome in photoperiodic induction:
Two-phytochrome pool theory.
Physiol. Plant. **61**, 675 - 682
- Thomas, B., Penn, S.E., Butcher, G.W., Galfre, G. (1984 b):
Discrimination between the red- and far-red-absorbing forms of phytochrome from Avena sativa L. by monoclonal antibodies.
Planta **160**, 382 - 384
- Thümmeler, F., Rüdiger, W., Cmiel, E., Schneider, S. (1983):
Chromopeptides from phytochrome and phycocyanin, NMR-studies of the P_R and P_F chromophores of phytochrome and E, Z isomeric chromophores of phycocyanin.
Z. Naturforsch. **38 c**, 359 - 368
- Thümmeler, F., Rüdiger, W. (1983):
Models for the photoreversibility of phytochrome. Z,E - Isomerization of chromopeptides from phycocyanin and phytochrome.
Tetrahedron **39**, 1943 - 1951

Thümmeler, F., Eilfeld, P., Rüdiger, W., Moon, D.K., Song, P.S. (1985):

On the chemical reactivity of the phytochrome chromophore in the P_r and P_{fr} -form.

Z. Naturforsch. 40 c, 215 - 218

Tobin, E.M., Silverthorne, J. (1985):

Light regulation of gene expression in higher plants.

Ann. Rev. Plant Physiol. 36, 569 - 593

Tokuhisa, J.G., Daniels, S.M., Quail, P.H. (1985):

Phytochrome in green tissue: Spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light grown Avena sativa.

Planta 164, 321 - 322

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979):

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350 - 4354

Trewavas, A. (1976):

Post-translational modification of proteins by phosphorylation.

Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 349 - 374

Vierstra, R.D., Quail, P.H. (1982 a):

Native phytochrome: Inhibition of proteolysis yields a homogeneous monomer of 124 kDa from Avena.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5272 - 5276

Vierstra, R.D., Quail, P.H. (1982 b):

Proteolysis alters the spectral properties of 124 kDa-phytochrome from Avena.

Planta 156, 158 - 165

Vierstra, R.D., Quail, P.H. (1983):

Purification and initial characterization of 124 kDa-phytochrome from Avena.

Biochemistry 22, 2498 - 2505

Vierstra, R.D., Cordonnier, M.M., Pratt, L.H., Quail, P.H. (1984):

Native phytochrome: Immunoblot analysis of relative molecular mass and in vitro proteolytic degradation for several plant species.

Planta 160, 521 - 528

Vierstra, R.D., Langan, S.M., Haas, A.L. (1985):

Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant, Avena sativa.

J. Biol. Chem. 260, 12015 - 12021

Vierstra, R.D., Quail, P.H. (1986):

The protein, in photomorphogenesis in plants.

Edited by R.E. Kendrick and G.H.M. Kranenberg, p. 35 - 60.

Vierstra, R.D., Quail, P.H., Hahn, T.R., Song, P.S. (1987):

Comparison of the protein conformations between different forms (P_r and P_{fr}) of native (124 kDa) and degraded (118/114 kDa) phytochrome from Avena sativa.

Photochem. Photobiol. 45, 429 - 432

Wong, Y.S., Cheng, H.C., Walsh, D.A., Lagarias, J.C. (1986):

Phosphorylation of Avena phytochrome in vitro as a probe of light-induced conformational changes.

J. Biol. Chem. 261, 12089 - 12097

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Für die hervorragende Betreuung und hilfreiche Förderung der Arbeit, sowie für wertvolle Diskussionen bin ich Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger zu großem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Lottspeich und seiner Lora für die großzügige Durchführung zahlloser Sequenatorläufe, sowie dem gesamten Arbeitskreis Mikrosequenzierung vom Genzentrum München - Martinsried, insbesondere aber Christoph, Sepp, Gaby, Margit und Werner, für die freundliche Aufnahme und große Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. H.J.A.W. Schneider und Herrn Dr. H. Schwarz, Botanisches Institut der Universität Köln, danke ich ebenso für die freundliche Überlassung von monoklonalen Antikörpern wie Herrn Prof. Dr. S. Roux, University of Athens, Texas.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Huber und Frau Meier, MPI für Biochemie in München - Martinsried, bedanke ich mich für die Einführung in die Technik der Kristallisation von Proteinen und für die Überlassung von Kristallisationsschalen.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. A. Henschen und Herrn Georgopoulos, MPI für Biochemie in München - Martinsried, für die Durchführung der Aminosugaranalysen.

Herrn Prof. Dr. A. Hager und Theo Priester, Botanisches Institut der Universität Tübingen, danke ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der Phosphorylierungsversuche von Phytochrom mit der PL-Kinase.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Frl. Claudia Zenger für ihrer engagierte und wertvolle Mitarbeit bei allen möglichen und unmöglichen Versuchen, bei der Präparation von Phytochrom, sowie bei der Erledigung von Schreibarbeiten am Computer.

Frl. M. Binder danke ich für ihre tatkräftige Mitarbeit bei der Präparation von Phytochrom in der ersten Hälfte meiner Dissertationsarbeit, sowie Herrn R. Schendel für seine Geduld beim Einarbeiten in das Phytochromgebiet.

Bei allen Angehörigen des Botanischen Instituts möchte ich mich für die freundliche Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Der DFG danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt ein Dank ganz besonderer Art meiner Frau für ihre Geduld und für ihr Verständnis, die ganz besonders in der heißen Endphase der Dissertationsarbeit sehr stark in Anspruch genommen worden sind.

Lebenslauf

07.06.1959	Geburt in Dillingen/Donau
1965 - 1969	Volksschule in Dillingen
1969 - 1979	Johann-Michael-Sailer Gymnasium in Dillingen
1979	Abitur
1980	Beginn des Lebensmittelchemiestudi- ums an der Ludwig-Maximilians-Univer- sität in München
1982	Lebensmittelchemische Vorprüfung
1984	Erste Staatsprüfung für Lebensmittel- chemiker
Feb. 1985	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger

